



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Myrcia macrocalyx* Faria &  
Soares-Silva (Myrtaceae), ESPÉCIE RARA DO CERRADO COM POTENCIAL  
ORNAMENTAL**

**Renata Uchôa Alves**

Orientadora: Lucia Helena Soares-Silva

Julho, 2017



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Myrcia macrocalyx* Faria &  
Soares-Silva (Myrtaceae), ESPÉCIE RARA DO CERRADO COM POTENCIAL  
ORNAMENTAL**

Renata Uchôa Alves

Orientadora: Lucia Helena Soares-Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UNB), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Julho, 2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse estudo aos meus amados pais por sonharem meu sonho e por me mostrarem que, sim, é possível torná-lo realidade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Prof.<sup>a</sup> Andrea Libano tanto por me colocar em contato com o universo apaixonante da botânica assim como me apoiar, noites a fio, a ingressar no mestrado. Andrea é para mim uma grande orientadora, pois esteve nessa função em várias frentes da minha vida pessoal e profissional: como graduanda no ensino superior, colega de trabalho e hoje como uma grande amiga.

Além dela, nesses dois anos de estudo, duas profissionais me inspiraram e ajudaram a alcançar essa conquista. São elas: a minha atual orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Helena Soares e Silva e minha querida “chefe” Magda Verçosa Carvalho Branco - uma gestora compreensiva, humana e competente a quem tenho muita admiração e carinho. Nesse período, elas não me deram se quer uma “colher de chá” e a explicação estava na crença no meu potencial. Hoje, graças a elas estou aqui, com a missão de carregar na minha bagagem profissional tal confiança dedicada a mim. Agradeço também a professora Conceição Eneida pela oportunidade de trabalhar com cultura de tecidos.

Durante o mestrado tive a alegria de ter um “irmão de orientação” o Rafael Nyemayer, que esteve comigo nos momentos mais difíceis de execução, dividindo campos, alegrias e angústias. Posso afirmar com convicção que além de um título profissional ganhei um amigo. Obrigada Rafa, o mestrado ficou mais leve depois que me ajudou a carregar.

Não poderia deixar de citar a minha família pelo amor incondicional. Além do carinho familiar, contei com uma ajuda mais do que especial do meu pai, Gilberto Fernandes Alves, o grande artista responsável pelas lindas fotografias. Ele sonhou, sofreu e realizou na prática essa conquista ao meu lado. Obrigada “papy”, essa é mais uma das suas inúmeras vitórias.

Reforço também a importância da minha querida mãe Annette Uchôa Chaves. Uma mulher guerreira e positiva que sempre foi capaz de me indicar o caminho da luz nos dias mais tenebrosos. Mariana Uchôa Alves Romariz, minha irmã, também tem um espaço importante nessa jornada. Ela que, mesmo de longe, conseguiu se fazer presente sempre que precisei de um colo e dicas de gramática.

Não posso deixar de agradecer meus amigos (tanto os antigos como os novos) e colegas de trabalho. Eles que permaneceram ao meu lado, insistiram no meu potencial e acreditaram em mim mesmo na minha ausência. Muitos deles fizeram parte desse trabalho, botânicos, ecólogos e de outras áreas ajudando com campos, experimentos, cálculos, formatação, edições e traduções. E no fim desse trajeto, a frase “quem tem amigos tem tudo” sem dúvida faz todo o sentido na minha cabeça. Obrigada, amigos.

Agradeço também ao meu querido companheiro, Antônio Prado, que esteve ao meu lado nesse finalzinho me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. E agradeço ao meu gatinho, Niklaus, por tornar dias difíceis em noites tranquilas.

Por último e não menos importante, gostaria de agradecer também a *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae), uma grande inspiração que carinhosamente passei dois anos chamando de “minha plantinha”. Lembro-me a alegria que senti quando a encontrei no meu primeiro campo. Foi uma grande emoção presenciar na prática e vida acontecer dentro de um tubo de ensaio e sonhar que um dia voltasse a acontecer no ambiente natural.

Após essa grande trilha hoje eu digo, feliz e realizada, que “veja flores por todos os lados” e que continue assim!

**Obrigada!**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>3</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
1. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE DE ESTUDO	7
2. GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS	8
3. CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS	10
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS DE <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria &amp; Soares-Silva (Myrtaceae), ESPÉCIE RARA DO CERRADO COM POTENCIAL ORNAMENTAL .....</b>	<b>27</b>
<b>Resumo</b>	<b>27</b>
<b>Abstract</b>	<b>28</b>
<b>Introdução</b>	<b>29</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>32</b>
<b>Resultados</b>	<b>36</b>
<b>Discussão</b>	<b>44</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>47</b>
<b>Referências</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE BROTO E RIZOGÊNESE EM EXPLANTES GERMINADOS <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria &amp; Soares-Silva (Myrtaceae): ESPÉCIE ENDÊMICA DO CERRADO.....</b>	<b>53</b>
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
3. RESULTADOS	57
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO	63
6. AGRADECIMENTOS	63
7. REFERÊNCIAS	63
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1:</b> Flores de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva em área de campo sujo no município de Cavalcante – GO.....	7
---	---

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1:</b> <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva (Myrtaceae). Flor e frutos, com o pericarpo ressecado expondo as sementes.....	37
<b>Figura 2:</b> Desenvolvimento de plântulas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva germinadas em diferentes substratos em casa de vegetação. ....	41
<b>Figura 3:</b> Sementes e fases sucessivas de desenvolvimento da plântula de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva germinadas no substrato vermiculita.....	42

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1:</b> Multiplicação de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva.....	60
--	----

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1:</b> Micropropagação com espécies da família Myrtaceae.....	16
---	----

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1:</b> Biometria dos frutos de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva coletados no município de Cavalcante – GO.....	37
<b>Tabela 2:</b> Biometria das sementes de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva coletadas no município de Cavalcante – GO.....	38
<b>Tabela 3:</b> Porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Emergência – IVE e Tempo Médio de Germinação – TMG de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva em diferentes tratamentos em casa de vegetação, obtidos aos 45 dias após a semeadura ....	39
<b>Tabela 4:</b> Caracteres morfológicos de plântulas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva, cultivadas aos 45 dias, em diferentes substratos. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Caracteres morfométricos das plântulas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva com 45 dias após a semeadura em diferentes tratamentos. ....	43

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1:</b> Caracteres morfométricos de 40 plântulas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva germinadas <i>in vitro</i> aos 45 dias após a inoculação (ágar-água) .....	57
<b>Tabela 2:</b> Peso da matéria fresca, seca e teor de água (%) das plântulas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva germinadas <i>in vitro</i> aos 45 dias após a inoculação na solução ágar-água .....	57
<b>Tabela 3:</b> Multiplicação e alongamento de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva .....	58
<b>Tabela 4:</b> Multiplicação e alongamento de folhas de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva. ....	58
<b>Tabela 5:</b> Presença de calos em explantes da raiz e do hipocótilo de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva em 7 tratamentos .....	59
<b>Tabela 6:</b> Efeito do AIB e do carvão ativado no alongamento de brotos de <i>Myrcia macrocalyx</i> Faria & Soares-Silva. ....	59



## INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 46.430 espécies autóctones distribuídas nos seis biomas de que é composto (Flora do Brasil, 2017). Dentre esses, o Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo em relação à biodiversidade, variedade de ecossistemas e flora nativa (Brasil, 2017). Ocupa aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup> do território brasileiro (Myers *et al.*, 2000; Brasil, 2017), o que representa cerca de 22% do Brasil coberto, originalmente, por cerrado (Martinelli *et al.*, 2014; Brasil, 2017). Na última compilação de espécies vegetais, publicada para o Cerrado em 2008, foram citadas 12.438 espécies de plantas, destas, 12.029 táxons, pertencentes às Angiospermas (Mendonça *et al.*, 2008).

Em função da ocupação acelerada e desordenada de áreas destinadas a exploração agrícola e pastagens (Klink & Machado, 2005; Magrin *et al.*, 2014), a cobertura vegetal nativa diminuiu em quase 50% de sua extensão em aproximadamente quatro décadas (Sano *et al.*, 2010). Os dados são alarmantes uma vez que 645 espécies da flora do Cerrado encontram-se ameaçadas de extinção, representando aproximadamente 30% das espécies brasileiras elencadas na Lista vermelha do Brasil (Martinelli & Moraes, 2013). Agravando tais dados, Scariot *et al.* (2005) estimam que a maioria das herbáceas e ervas listadas nessa publicação são exclusivas desse bioma.

Devido a rica biodiversidade, o alto índice de endemismo e grau elevado de degradação ambiental, o Cerrado se enquadra no conceito de *Hotspot de biodiversidade* (Myers *et al.*, 2000; Mittermeyer *et al.*, 2005).

As publicações “*Livro Vermelho da Flora do Brasil*” e “*Livro Vermelho da Flora do Brasil: plantas raras do Cerrado*”, lançados pelo Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora (Martinelli & Moraes, 2013; Martinelli *et al.*, 2014), respectivamente, revelaram dados alarmantes em relação a quantidade de espécies ameaçadas de extinção para o bioma Cerrado. Tais listas são mais extensas e completas quando comparadas a dos anexos da Instrução Normativa nº 6 do Ministério do Meio Ambiente - MMA de 23 de setembro de 2008 (Brasil, 2008). O documento instruiu, em seu Art. 5º, que fossem elaborados e implementados planos de ação para a retirada de espécies das listas vermelhas no prazo máximo de cinco anos - a partir da data de publicação – sob a coordenação do Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade e do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, com a participação de órgãos governamentais da comunidade científica e da sociedade civil organizada. O prazo de cinco anos se esgotou em 2013, quando foi publicado o *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Ao invés de um plano de ação, obteve-se uma listagem ainda mais preocupante sobre uma iminente perda de biodiversidade brasileira.

Porém, ao mesmo tempo em que o desequilíbrio ambiental avançou, a sociedade começou a se preocupar com o meio ambiente (Rede de Sementes do Cerrado, 2011). É perceptível o aumento pela procura de mudas de espécies nativas (Fonseca *et al.*, 2001; Rego *et al.*, 2009). A explicação desse movimento está tanto na valorização das espécies, como na necessidade de recuperação das Áreas de Preservação Permanente (APP) e das Áreas de Reserva Legal (ARL) indicadas pelo código florestal (Oliveira *et al.*, 2016).

São poucas as informações sobre o cultivo de espécies nativas do Cerrado (Bardivieso *et al.*, 2011). Isso implica negativamente em programas de conservação (Oliveira *et al.*, 2016). Autores como Silva *et al.* (2003) e Zamith & Scarano (2004) relatam a ausência de tecnologias específicas para produção de mudas nativas. Portanto, são prementes estudos que possam amenizar a situação atual de perda expressiva da diversidade vegetal brasileira.

Para que uma espécie seja retirada da lista de ameaçada de extinção, é preciso uma produção de mudas em número suficiente para que possam ser reintroduzidas em meio natural e mantidas em coleções *ex situ*. Desta forma, chegamos à possibilidade de utilização da técnica de cultura de tecidos como uma ferramenta extremamente útil já que possibilita a produção de plantas em grande quantidade (Souza & Pereira, 2007; Mondo *et al.*, 2008; Cid & Teixeira, 2014; Scherwinski-Pereira & Costa, 2014), além de preservar a diversidade genética com o objetivo de torná-las fonte futura de variabilidade (Radzan, 2003; Siddique *et al.*, 2003; Fermino-Junior *et al.*, 2009).

Ainda são poucos os protocolos de germinação *in vitro* e micropropagação estabelecidos para espécies do Cerrado (Oliveira *et al.*, 2001; Rios *et al.*, 2001; Santos, *et al.*, 2006; Martinotto *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2011; Pêgo *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015). Os estabelecimentos de protocolos de micropropagação efetivos ajudam na análise da possibilidade de indivíduos produzidos *in vitro* se desenvolverem na natureza, contribuindo para o crescimento das populações de baixa representatividade – considerado um dos motivos pelos quais algumas espécies estão em risco (Martinelli *et al.*, 2014).

Para isso, é necessário conhecer os processos reprodutivos e desenvolvimento das fases iniciais das espécies nativas (Soriano & Torres, 1995), além de elaborar e protocolos de propagação das espécies do Cerrado para fornecer subsídios para os projetos de conservação das espécies ameaçadas. Atitudes como essa, permitem o estímulo de processos de conservação *ex situ*, *in situ* e valoração das espécies do Cerrado perante a população - que muitas vezes desconhece sua diversidade e potencial por não estar em contato com as plantas nativas (Bezerril, 2009).

Diante do exposto o presente trabalho tem como objetivo estabelecer protocolos de germinação e de micropropagação para *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae) e descrever a morfologia das fases iniciais de desenvolvimento dos indivíduos da espécie.

## REFERÊNCIAS

- BARDIVIESSO, D. M.; MARUYAMA, W. I.; REIS, L. L.; MODESTO, J. H.; REZENDE, W. E. Diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de guabiroba (*Campomanesia pubescens* O.Berg). *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. 18(1): 52–59. 2011.
- BEZERRIL, M. *Vivendo o cerrado e aprendendo com ele*. Ed. Saraiva. São Paulo, 2009. 80p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. *Instrução normativa n° 6*. 2008. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/179/\\_arquivos/179\\_05122008033615.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf)> Acesso em: 10.07.2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. *O Bioma Cerrado*. 2017. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 10.07.2017.
- CID, L.P.B; TEIXEIRA, J.B Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: CID, L.P. *Cultivo in vitro de plantas*. 3° edição. EMBRAPA, Brasília, 2014. 325p.
- FERMINO-JUNIOR, P.C.P., NAGAO, E.O., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.). *Scientia Agricola*, Piracicaba, 37(84): 427-435, 2009.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 10.07.2017
- FONSECA, C.E.L; RIBEIRO, J.F.; SOUZA, C.C.; REZENDE, R.P.; BALBINO, V.K. Recuperação da vegetação de matas de galeria: estudos de caso no Distrito Federal e entorno. *In*: RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L. da; SOUZA-SILVA, J.C. (Ed.). *Caracterização e recuperação de matas de galeria*. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2001. 815-870p.

HERRERA, R.C.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; SALGADO, C.C.; MAGALHAES, M.M.; SOARES, F.P. Índice mitótico e viabilidade celular de calos embriogênicos de murici-pequeno. *Revista Ciências Agrárias*. 54(1): 28-32. 2011.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147-155. 2005.

MAGRIN, G.O., J.A. MARENGO, J.-P. BOULANGER, M.S. BUCKERIDGE, E. CASTELLANOS, G. POVEDA, F.R. SCARANO, AND S. VICUÑA, América Central e do Sul. In: Mudanças Climáticas 2014: Impactos, Adaptação e Vulnerabilidade. Parte B: Aspectos Regionais. Contribuição do Grupo de Trabalho II para o Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido e Nova York, NY, Estados Unidos, 2014. 1499-1566p.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A.A. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). *Ciência e Agrotecnologia*. 31(6): 1668-1671, 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000600010.

MARTINELLI, G.; MESSINA, T; FILHO, L.S. *Livro Vermelho da Flora do Brasil – Plantas Raras do Cerrado*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio- Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014. 320 p.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.D. (eds.). *Livro vermelho da flora do Brasil*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio-Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Pp. 423-1279. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (eds.). *Cerrado: ecologia e flora*. v. 2. Brasília, Embrapa Informação e Tecnologia, 2008.

MITTERMEYER, R. A.; ROBLES, P.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T., MITTERMEYER, C. G.; LAMOREUX J.; FONSECA, G. B. *Hotspot Revised: earth's biologically richest and most endangered ecoregions*. Conservation International. Mexico, 2005.

MONDO, V.H.V; BRANCALION, P.H.S.; CICERO, S.M.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; DOURADO NETO, D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). *Revista Brasileira de Sementes*. São Paulo, 30(2): 177-183, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature*, Reino Unido, 403:853-858. 2000.

OLIVEIRA, M.C.; OGATA, R.S.; ANDRADE, G.A.; SANTOS, D.S.; SOUZA, R.M.; GUIMARAES, T.G.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; PEREIRA, D.J.; RIBEIRO, J.F. *Manual*

de viveiro e produção de mudas: *Espécies arbóreas nativas do Cerrado*. Ed. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F., SILVA-RIOS, M. N.; REZENDE, M. E. *Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria*. Recomendação técnica 41, EMBRAPA Cerrados. Brasília, 2001. 4p.

PÊGO, R.G.; PAIVA, P.D.O; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. *Ciência e Agrotecnologia*. 37(1): 32-39. 2013.

RAZDAN, M.K. *Introduction to plant tissue culture*. 2° ed. Enfield: Science Publishers, 2003. 287-306p.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. *Semeando o bioma cerrado – Beneficiamento, embalagem e armazenamento de sementes – Projeto semeando o Bioma Cerrado*. Ed. Rede de sementes do Cerrado, Brasília, 2011.

REGO, S.S.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S.; SANTOS, Á.F. dos. Germinação de sementes *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 31 (2): 212-220, 2009.

RIOS, M.N.S.; RIBEIRO, J.F.; REZENDE, M.E. Propagação vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L.; SOUSA-SILVA, J. C. *Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria*. Planaltina: EMBRAPA- CPAC. Brasília, 2001. 455-491p.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. *Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166: 113-124, 2010.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 28(2): 293-296. 2006. Doi: 10.1590/S010029452006000200031.

SCARIOT, A.; SILVA, J. C. S.; FELFILI, J. M. Cerrado: ecologia biodiversidade e conservação. In: FELFILI, J.M.; SILVA, J. C. S.; SCARIOT, A. (ed.). *Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços no conhecimento*. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2005. 27-44p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; COSTA, F.H.S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: CID, L.P. *Cultivo in vitro de plantas*. 3° edição. ENBRAPA, Brasília, 2014. 325 p.

SIDDIQUE, N.A.; BARI, M.A.; KHATUN, N.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.H.; HUDA, S. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (*Anantamul*) an endangered medicinal plant in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences*, 3:1158- 1163. 2003.

SILVA, C.V.; BILIA, D.A.C.; MALUF, A.M.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 26:213-221. 2003.

SILVA, L.C; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.P.C.; BARBOSA, S.; HERRERA, R.C. Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. *Ciência Rural*, Santa Maria, 45(4): 674-679. 2015.

SORIANO, S.; TORRES, R.B. *Descrição de plântulas de árvores nativas*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 9., 1992, Ilha Solteira. Anais... Campinas: SBSP, 27-46p. 1995.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, 9(4): 103-11. 2007.

STEIN, V.C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, L.C.S., EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 1702-1708. 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000600015.

ZAMITH, L.R.; SCARANO, F.R. Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 161-176. 2004.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE DE ESTUDO

A espécie *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae) é típica de campos limpos e sujos da região da Chapada dos Veadeiros – GO e se apresenta como um subarbusto de aproximadamente 0,5 m de altura, xilopodífero, glabro com flores terminais ou raramente em botrioides de até cinco flores. Lobos do cálice (4-5) ovados a lanceolados. Folhas linear-lanceoladas ápice agudo a longo-acuminado, base aguda, brilhantes na superfície ventral, coriáceas na maturidade, 4 X 0,5 cm, venação reticulado-broquidódroma. Frutos globosos a elípticos, escassamente pubescentes com glândulas ligeiramente prominentes, 7.8-10.6 X 5.5-11 mm (Faria *et al.*, 2015).

A espécie foi descrita um ano depois do lançamento do “*Livro Vermelho da Flora do Brasil: plantas raras do Cerrado*” (Martinelli *et al.*, 2014), mas já se enquadra no critério de risco “em perigo” da União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN descrito na publicação. Não existem outros estudos sobre a espécie além do artigo de descrição de Faria *et al.* (2015).



**Figura 1:** Flores de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva em área de campo sujo no município de Cavalcante – GO.

## 2. GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

As sementes representam o fim de uma geração e início de outra. Elas são o diásporo, o mecanismo de sobrevivência e preservação da biodiversidade, visto que carregam o código genético da espécie e o potencial para originar outro indivíduo por meio do processo de germinação (Souza, 2009).

A germinação se inicia quando partes do embrião emergem para fora da testa da semente (Labouriau, 1983; Souza, 2009). Trata-se de um momento crucial no desenvolvimento das espécies vegetais (Labouriau, 1983), pois depende de fatores intrínsecos (da própria semente e oriundos da planta mãe) e extrínsecos (do ambiente) como, por exemplo, água, luz, temperatura, oxigênio, umidade relativa do ar e substrato, que pode apresentar diferentes características como nível de aeração, capacidade de retenção de água, grau de infestação de patógenos e outros (Baskin & Baskin, 1998; Brasil, 2009; Souza, 2009). A combinação dos fatores abióticos e bióticos desencadeiam diferentes resultados no cultivo das espécies (Laviola *et al.*, 2006).

Mesmo com o controle parcial de algumas das variáveis abióticas (incidência de luz, substrato e fornecimento de água) nem todas as espécies do Cerrado apresentam bons resultados ou facilidade na produção de mudas em viveiro (Oliveira *et al.*, 2016). Assim, fatores abióticos podem ser controlados e manipulados em ambiente laboratorial para aperfeiçoar o processo e gerar grande quantidade de plântulas vigorosas em curto período (Gomes *et al.* 2003; Noletto & Silveira, 2004; Melo *et al.*, 2008).

As sementes que germinam em condições ambientais favoráveis são denominadas “quiescentes”. Entretanto, sementes que em condições favoráveis não germinam são chamadas “dormentes”. A dormência é a falta de capacidade do embrião germinar em função de condições inerentes da semente como, por exemplo, a resistência de alguns tegumentos, imaturidade do embrião e arilo inibidor (Souza, 2009). Labouriau (1983) relata que a dormência é um mecanismo capaz de regular o início da germinação e está ligado a área de ocorrência das espécies ou mecanismos de sobrevivência. Pinhal *et al.* (2011) descrevem que a dormência, a recalcitrância e a heterogeneidade no processo de maturação de frutos e sementes são características comuns nas espécies do Cerrado, o que pode interferir no processo de propagação dessas espécies.

Para avaliar o processo de germinação, existem algumas medidas como, por exemplo, a porcentagem de sementes germinadas em relação a um total de sementes dispostas à germinar em condições experimentais (Ferreira e Borguetthi, 2004).



O Tempo Médio de Germinação (TMG) é o que determina o tempo necessário para um conjunto de sementes germinar e é calculado por meio da fórmula de Silva & Nakagawa (1995) onde  $TMG = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$ ,  $n_i$  = número de sementes germinadas por dia e  $t_i$  = tempo de incubação.

Já o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) determina a velocidade que as sementes precisam para germinar. Considerando o critério agrônomo, IVG pode ser substituído por IVE, onde “E” significa Emergência do solo (IVE) (Ferreira e Borguetthi, 2004). O cálculo do Índice de Velocidade de Emergência ou de Germinação segue a seguinte regra:  $IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$ . Detalhadamente, IVE = índice de velocidade de emergência;  $E_1, E_2, \dots, E_n$  = número de plântulas computadas na primeira, segunda e última contagem respectivamente e  $N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias da semeadura (Maguire, 1962).

Nakagawa (1999) relata que quanto maior o IVG/IVE maior a velocidade de germinação e, conseqüentemente, maior o vigor das sementes. Souza (2009) indica que o vigor das sementes é uma das características intrínsecas capaz de influenciar o potencial de germinação ou emergência rápida e uniforme das sementes, bem como assegurar o bom desenvolvimento plântulas em determinadas condições.

Morfologicamente, o processo de germinação é classificado em criptocotiledonar, quando os cotilédones permanecem no interior do diásporo, ou fanerocotiledonar, quando as folhas cotiledonares são expostas (Souza, 2009). Em relação aos aspectos morfofisiológicos, a germinação é classificada como epígea ou hipógea. A germinação epígea ocorre quando o hipocótilo se alonga e eleva os cotilédones (clorofilados) acima do solo. A germinação hipógea ocorre quando os cotilédones se mantêm abaixo do solo expondo apenas o epicótilo. Nesse caso, as reservas dos cotilédones são utilizadas até se esgotarem e depois se decompõem (Souza, 2009).

A fase de plântula é iniciada com a emergência de partes do embrião para fora da semente. O período em que o indivíduo se mantém nessa fase é característico de cada espécie (Labouriau, 1983; Souza, 2009). Do ponto de vista morfológico, a definição de Souza (2009) parece ser a mais adequada: a fase de plântula inicia-se pela protusão de partes do embrião para fora da semente e seu término é marcado pela completa expansão do primeiro eófilo. Após esse momento inicia-se a fase de tirodendro que se mantém até o surgimento do primeiro metafilo. É importante ressaltar que definir essas fases é algo complicado, visto que algumas espécies apresentam eófilos e metafilos

morfologicamente similares, sendo necessária uma análise específica para a classificação (Souza, 2009).

Assim como a definição da fase final de plântula, a literatura apresenta várias classificações dos tipos de plântulas que as espécies possuem (Souza, 2009). Duke (1965) subdivide as plântulas em criptocotiledonar, quando os cotilédones estão envoltos pelos envoltórios da semente e/ou fruto e fanerocotiledonar quando os cotilédones estão livres dos envoltórios. Rizzini (1965) subdivide a classificação em plântulas epigeias (que expõem os cotilédones na superfície do solo) e hipogeias (que mantêm o hipocótilo e cotilédones no interior do solo). Ng (1978) em estudo com 210 espécies de plantas lenhosas estabeleceu quatro grupos de plântulas: as epigeias (quando o hipocótilo bem desenvolvido expõem as folhas cotiledonares acima do solo), as hipógeas (em que o hipocótilo curto não expõe os cotilédones acima do solo), as semi-hipogeias (que mesmo com um hipocótilo curto expõem os cotilédones acima do solo) e as plântulas *Durian* (de germinação epígea com hipocótilo desenvolvido, mas os cotilédones não são expostos, pois estão envolvidos por algum tegumento). Não existe registro desse tipo de plântula em regiões tropicais (Souza, 2009).

### 3. CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

O cultivo *in vitro* é uma técnica baseada na totipotência das células vegetais para realizar organogênese ou embriogênese em condições favoráveis de luz, temperatura e meio de crescimento (Termignoni, 2005). Esse cultivo possibilita a produção e multiplicação de células, tecidos e órgãos das plantas (Carvalho *et al.*, 2006; Hussain, *et al.*, 2012). Entre os métodos estudados é possível destacar a micropropagação, processo de propagação assexuada que consiste na inoculação asséptica de explantes, pequenos segmentos de partes da planta, como fragmentos de raiz, hipocótilo, epicótilo, cotilédone, folhas, flores e outros, em meio nutritivo sob condições controladas (Grattapaglia & Machado, 1998; Pereira, 2004; Cid & Teixeira, 2014).

A aplicação da técnica de micropropagação tem ganhado espaço na atualidade a partir do desenvolvimento de pesquisas (Pereira *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Chinnappan *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014), visto que disponibiliza explantes livres de contaminação para o desenvolvimento de estudos de regeneração de tecidos, transformação genética, manutenção de coleções de genótipos e, consequentemente, preservação de espécies ameaçadas por meio da produção de grande

quantidade de mudas constantes e independentemente do período do ano (Merceier *et al.*, 1992; Cabral *et al.*, 2003; Siddique *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007; Sathyanarayana & Varghese, 2007; Nicioli *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Chinnappan *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011; Thorpe, 2012). Outra vantagem é que em condições *in vitro* as variáveis podem ser controladas, o que é útil para espécies que, em condições de viveiro, apresentam baixa germinabilidade (Gomes *et al.*, 2003; Noletto & Silveira, 2004; Melo *et al.*, 2008).

Para estabelecer protocolos de micropropagação, Grattapaglia & Machado (1998) dividem o procedimento em etapas – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo em condições assépticas; multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação e transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para o solo. Os mesmos autores esclarecem que os protocolos podem ser alterados mediante as especificidades das espécies que estão sendo trabalhadas, uma vez que as mesmas apresentam fatores genéticos únicos e diferentes atividades fisiológicas de acordo com a planta matriz.

A obtenção de tecido descontaminado é relatado com frequência como fator limitante para o desenvolvimento da primeira etapa da pesquisa (Grattapaglia & Machado, 1998) visto que os microrganismos responsáveis pela contaminação competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura (Pereira & Fortes, 2003). Bonga (1982) afirma que a contaminação por microrganismos é comum em pesquisas *in vitro*, principalmente para espécies lenhosas.

Alguns autores propõem protocolos de assepsia, agentes ou substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de microorganismos ou patógenos (Souza *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Bertozzo & Machado, 2010; Silveira *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014) ou a utilização de explantes a partir de plantas germinadas *in vitro* (Bonga, 1982; Santos *et al.*, 2006; Martinotto *et al.*, 2007; Dewir *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014), dispensando a etapa de desinfestação, desde que manuseado em condição asséptica (Pinhal *et al.*, 2011).

A assepsia é comumente realizada por meio de alvejantes comerciais a base de cloro ativo geralmente tendo como fonte o hipoclorito de sódio (NaOCl). A aplicação pode ser feita por imersão em diferentes tempos, de acordo com o grau de contaminação dos explantes e, posteriormente, enxague em água esterilizada, para retirar o resíduo da substância desinfetante (Pereira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011; Cid & Teixeira,

2014). Silva *et al.* (2014) obtiveram o resultado de 98% de descontaminação das sementes de *Eugenia uniflora* L. após 25 minutos de imersão em NaOCl (1,25%) o que comprova a eficácia do produto.

Cada espécie vegetal requer um meio de cultura específico para se desenvolver (Santos *et al.*, 2005; Cid & Teixeira, 2014). Entre os meios utilizados com frequência estão o MS (Murahige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980). O meio MS tem sido relatado como eficiente para espécies vegetais herbáceas. Para as espécies lenhosas, o mais indicado é a redução do teor de macronutrientes por meio de diluições do meio original ou adoção do meio WPM (Melo *et al.*, 1999; Bertozzo & Machado, 2010).

O grande desafio da cultura de tecidos é o ajuste de um protocolo eficiente que supra as necessidades da espécie, tornando-a propícia à multiplicação (Bertozzo & Machado, 2010). Para isso, é preciso proporcionar a interação e equilíbrio entre as substâncias de crescimento presentes na planta (hormônios) e dos análogos sintéticos (reguladores de crescimento ou fitorreguladores), aos quais são adicionados ao meio de cultura (George, 1996; Cid & Teixeira, 2014) para controlar os aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos (Pasqual, 2001).

Os reguladores do crescimento mais utilizados são as auxinas e citocininas (Skoog e Miller, 1957; Caldas *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 2012; Cid & Teixeira, 2014;). As auxinas controlam o crescimento e o alongamento celular, enquanto as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical (Pasqual, 2001; Cid & Teixeira, 2014). Porém, a resposta aos reguladores de crescimento varia de acordo com a espécie cultivada, esse fato pode ser observado no trabalho desenvolvido por Bastos *et al.* (2007), onde os explantes de *Hancornia speciosa* Gomes responderam de maneira diferente aos estímulos conjuntos de citocininas e auxinas em relação ao estudo de Santos *et al.* (2006) com *Caryocar brasiliense* Camb. quando expostas a esses grupos de reguladores de crescimento.

Das citocininas comercialmente disponíveis, o 6-benzilaminopurina (BAP) é reconhecido pela grande influência na indução de brotos de diferentes espécies (Torres *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2006) e considerada uma etapa essencial para garantir a continuidade das demais fases da propagação *in vitro* (Galvanesse *et al.*, 2007). Os resultados, porém, variam muito em relação a respostas das espécies sobre as concentrações dessa citocinina (Cid & Teixeira, 2014). Para Nogueira (2003), as concentrações de BAP acima de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> não foram eficientes na indução de brotos

para espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss., enquanto para Soares *et al.* (2007) concentrações de 1,0 ou 2,0 mg.L<sup>-1</sup> promoveram a multibrotação de segmentos nodais de *Hancornia speciosa* Gomes. Resultado divergente foi obtido por Stein *et al.* (2007), que constataram que o BAP reduziu o número de brotações e o número de folhas de explantes de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.).

As auxinas mais utilizadas são ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indol-3-acético (AIA) (Santos *et al.*, 2006), conhecidos por promover o enraizamento (Assis & Teixeira, 1998). Autores como Mereti *et al.* (2002); He *et al.* (2007); Dewir *et al.* (2010) e Dewir *et al.* (2011) tiveram sucesso na obtenção de raiz utilizando AIB, inclusive em espécies lenhosas de áreas tropicais (Yadav *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1999; Malik *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2006).

Existem ainda estudos que relatam resultados satisfatórios de combinações de auxinas e citocininas, como no caso de Stein *et al.* (2007) quando, estudando a espécie *Inga vera* subsp. *affinis*, obtiveram um aumento do número de brotações quando combinado ANA (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) e diferentes concentrações de BAP.

A fase de enraizamento ou indução de raízes é um processo complexo e envolve fatores endógenos e exógenos ainda não completamente esclarecidos (Lemos, 2014), podendo ser dividida em indução, iniciação e alongamento. As duas primeiras etapas são, normalmente, estimuladas pelas auxinas e a última pode ser inibida pela presença desses fitorreguladores (Ono & Rodrigues, 1996; McCown, 1998). De acordo com Lemos (2014), o AIB é a auxina que apresenta os melhores resultados na indução de raízes na cultura de tecidos como no estudo de Pandey *et al.* (2006) com a espécie *Terminalia arjuna* Roxb.

Souza & Pereira (2007) fizeram uma revisão bibliográfica que descreve variáveis que podem influenciar na obtenção de raízes como, por exemplo, os níveis de auxinas endógenas, condições bióticas da espécie e do explante (genótipo e juvenilidade), condições de cultivo, composição do meio de cultura, concentrações dos carboidratos, minerais, reguladores do crescimento e substâncias que podem ser adicionadas ao meio como o carvão ativado. Fachinello *et al.* (1995) ressaltam que a lignificação das espécies também é um fator que pode dificultar o enraizamento de segmentos nodais, visto que espécies herbáceas apresentam alta atividade meristemática e pouca lignificação.

O carvão ativado tem sido incorporado aos meios de cultura visando melhorar o desenvolvimento ou estimular a organogênese (Cid & Teixeira, 2014). Trata-se de uma substância que apresenta efeito, considerado por Grattapaglia e Machado (1998), como físico e químico. Físico, porque simula a condição de escuro, comum para o desenvolvimento de raízes que se encontram abaixo do solo. E químico por adsorver substâncias prejudiciais e tóxicas como compostos fenólicos. No entanto, essa propriedade de adsorção pode prejudicar o desenvolvimento do explante retirando do meio auxinas, vitaminas e nutrientes (Assis & Teixeira, 1998; McCown, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Cid & Teixeira, 2014). O emprego de carvão ativado favoreceu o desenvolvimento e enraizamento de plantas de *Hancornia speciosa* no trabalho desenvolvido por Ledo *et al.* (2007).

Há, contudo, outras questões a serem ponderadas ao utilizar técnicas de cultura de tecidos. Como o custo e a qualidade e estabilidade genética das espécies (Erig & Schuch, 2005; Ribeiro *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). O preço de mudas micropropagadas é considerado alto quando comparado às mudas produzidas em viveiros por meio de sementes (Rocha, 2013), mas atualmente a maioria de flores comercializadas são micropropagadas, visto que a qualidade de produção se elevou.

O custo da técnica exige planejamento em relação aos profissionais qualificados, perdas de material por contaminação, estrutura laboratorial, condições de aclimatização e aclimação, funcionamento e manutenção da sala de crescimento na intenção de reduzir ao máximo os gastos com o objetivo de competir com os métodos tradicionais de propagação em viveiros (Erig & Schuch, 2005; Ribeiro *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Pacheco *et al.* (2006) relatam que os resultados positivos obtidos por cultura *in vitro*, como possibilidade de produção de um grande número de plantas independente do período do ano, pode reduzir gastos de produção por parte dos viveiristas para algumas espécies que apresentam baixa germeabilidade em condições tradicionais. Ribeiro *et al.* (2013) indicam uma série de procedimentos visando diminuir o custo da técnica, afim de tornar o cultivo *in vitro* mais exequível comercialmente.

Alguns dos procedimentos indicados por Ribeiro *et al.* (2013) são: substituição de componentes do meio nutritivo e a substituição da autoclavagem pela esterilização química do meio nutritivo. Ribeiro e Teixeira (2008) realizaram experimentos substituindo o nitrato de potássio por salitre potássico no cultivo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e os resultados obtidos mostraram plantas com maiores comprimentos cultivadas nos meios nutritivos nos quais foi utilizado o salitre potássico.

A abordagem de adição de hipoclorito de sódio como esterilizante químico do meio nutritivo se mostrou eficaz para estudos com *Ananas comosus* cv. Smooth cayenne (Teixeira *et al.*, 2006), *Eucalyptus pellita* L. (Teixeira *et al.*, 2008) e banana (Matsumoto *et al.*, 2009). Outra possibilidade para reduzir os custos da micropropagação é a utilização de luz natural em Salas de Crescimento (Ribeiro *et al.*, 2013). Segundo Erig e Scuch (2005), a utilização de luz natural elimina gastos com luz artificial, reduz custos de construção e manutenção e diminui os estresses causados às plantas durante a fase de aclimatização.

Embora a área de estudo esteja em crescimento, autores relatam dificuldades no estabelecimento de protocolos para algumas espécies vegetais, como as espécies nativas do Cerrado - refletido na escassez de literatura (Oliveira *et al.*, 2001; Rios *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2013). A literatura é ainda mais limitada sobre a utilização da técnica de micropropagação com objetivo de conservação de espécies ameaçadas, visto que a grande maioria dos estudos tem um enfoque de produção voltado para o comércio de plantas.

Algumas espécies do Cerrado já foram estudadas com a utilização de técnicas de cultura de tecidos como, por exemplo, *Gomphrena macrocephala* A.St.-Hil. (Moreira *et al.*, 1999), *Sinningia allagophylla* (Mart.) Wiehler (Almeida & Shepherd, 1999; Gomes & Shepherd, 2000), *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (Melo, 2000), *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza (Pereira *et al.*, 2003), *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007), *Hancornia speciosa* Gomes (Ledo *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2007), *Eugenia dysenterica* DC. (Martinotto *et al.*, 2007), e *Jacaranda ulei* Bureau and K. Schum (Silveira *et al.*, 2013).

O conhecimento sobre a aplicação da cultura de tecidos para a família Myrtaceae ainda é limitado, embora já existam alguns registros de estudos que podem direcionar pesquisas – exemplificados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Micropropagação com espécies da família Myrtaceae.

Espécie	Meio de cultura	Reguladores do crescimento	Tipo de explante	Referências
<i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret	WPM + 1,5 gL <sup>-1</sup> de carvão ativado	BAP (0,05; 0,5; 5 e 50 µM); Kin (0,05; 0,5; 5 e 50 µM); 2-iP (0,05; 0,5; 5 e 50 µM); AIB (20 µM).	Segmentos nodais.	Oltramari <i>et al.</i> , 2000
<i>Campomanesia adamantium</i> CAMB.	WPM	BAP (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> ); AIB (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> ); AIA (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> ); ANA (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> ).	Segmentos nodais (1cm).	Rossato <i>et al.</i> , 2015
<i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden & Cabbage <i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden	½ MS	BAP (0,25; 0,50; 0,75; e 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ) ANA (0,01 mg.L <sup>-1</sup> ).	Brotações contendo de uma a duas gemas axilares.	Brondani, 2009
<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden	MS	AIA(0,05 a 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ); Zeatina (0,1 a 0,75 mg.L <sup>-1</sup> ) BAP (0,1 a 0,75 mg.L <sup>-1</sup> ).	Segmentos nodais da gema apical e gemas laterais.	Malyz <i>et al.</i> , 2011
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	MS		Germinação de sementes.	Martinotto <i>et al.</i> , 2007
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	WPM + 1,5/0,5 gL <sup>-1</sup> de carvão ativado	BAP (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L <sup>-1</sup> ); AIB (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L <sup>-1</sup> ).	Segmentos caulinares contendo duas gemas laterais.	Nascimento <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia involucrata</i> DC.	MS, 1/2 MS e WPM. 1,5/0,5 gL <sup>-1</sup> de carvão ativado	1 µM de ANA e 5 µM de TDZ.	Segmentos apicais e nodais coletados em plantas de três anos de idade.	Golle <i>et al.</i> , 2012
<i>Eugenia uniflora</i> L.	WPM	BAP (0,0; 5,0; 10 µM); Zeatina (0,0; 5,0; 10 µM) 2iP (0,0; 5,0; 10 µM).	Segmentos caulinares com três ou quatro gemas (0,5 a 1,0cm) sem ápice.	Souza <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia uniflora</i> L.	½ MS ágar/água	AIB 0,1 mg.L <sup>-1</sup> ; BAP 0,2 mg.L <sup>-1</sup> .	Segmentos de 1,5 cm. Germinação de sementes.	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Psidium guajava</i> L.	MS	BAP (1,0 mg.L <sup>-1</sup> ); Kn (1,0 mg.L <sup>-1</sup> ); IAA (0, 0,1, 0,5 ou 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ); NAA (0, 0,1, 0,5 ou 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ); IBA (0, 0,1, 0,5 ou 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ).	<i>Explants</i> nodais.	Rai <i>et al.</i> , 2009
<i>Psidium</i> sp.	MS	5µMde BAP.	Ramos com 30cm.	Souza <i>et al.</i> , 2006a
<i>Syzygium cordatum</i> Hochst.ex C.Krauss	MS	TDZ (0, 0,5, 1 e 2 mg.L <sup>-1</sup> ); IBA (0, 1 e 2 mg.L <sup>-1</sup> ) IBA (0, 1, 3 e 5 mg.L <sup>-1</sup> ).	Os brotos <i>in vitro</i> (3 a 4 cm).	Dewir <i>et al.</i> , 2011
<i>Ugni molinae</i> Turcz.	Ágar/água	GA3 (1, 10, 100 µM); BAP (1, 10, 100 µM); FLU (1, 10, 100 µM).	Germinação de sementes.	Beraud <i>et al.</i> , 2016



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.F.P. Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. X *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae, 2009. Dissertação de mestrado em Ciência Agrárias – Universidade de Brasília DF.
- ALMEIDA, V.P.; SHEPHERD, S.L.K. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): cultivation *in vitro* of a native plant of Brazilian cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 22: 381-384. 1999.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. 261-296p.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. New York: Academic Press, 1998.
- BASTOS, L.P.; SOUZA, M.J.; COSTA, M.A.P.; ROCHA, M.C.; HASEN, D. S.; SILVA, S.A.; DANTAS, A.C.V.L.; SOUZA, C.S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 1122-1124, 2007.
- BERAUD, M.R.; VÁSQUEZ, N.H.; DURÁN, X.A.; PÉREZ, J.T.; MARAMBIO, V.L.; RUBIO, C.C. Effects of gibberellic acid, benzylaminopurine and fluridone on the *in vitro* germination of *Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae). *Gayana Bot.* 73(1): 77-84, 2016
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I.S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 34(6): 1477-1482, 2010.
- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. *Tissue culture in forestry*. 2. ed. 1982. 4-35p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária - MARA. *Regras para análise de sementes*. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Departamento Nacional de Defesa Vegetal, Coordenação de Laboratório Vegetal, Brasília-DF. 2009.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunii* Maiden. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, 33(1): 11-19, 2009.
- CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T.C. Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.* Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 101, 2003. 4p.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1998, v.1, 87-132p.

- CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista brasileira de sementes*, 28(2): 15-25. 2006.
- CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; VITOR, S. M. M.; FERNANDES, A. M. Cultivo *in vitro* e aspectos da anatomia foliar de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae Papilionoideae]. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 3: 61-68, 2007.
- CHINNAPPAN, R. S.; RUTHAR, N.; SETHU, S. S. Rapid *in vitro* propagation of *Premna serratifolia*, a medicinally important declining shrub, Índia. *Conservation Evidence*, 8: 66-73, 2011.
- CID, L.P.B; TEIXEIRA, J.B Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P. *Cultivo in vitro de plantas*. 3° edição. ENBRAPA, Brasília, 2014. 325p.
- DAS, D.K ., PRAKASH, N.S., BHALLA-SARIN, N. Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi ( *Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Cell Rep*. 18: 691- 695. 1999.
- DEWIR, Y.H.; SHAIK, S.; SINGH, N.; NICHOLAS, A. Indirect regeneration of the Cancer bush (*Lessertia frutescens* L.) and detection of L-canavanine in *in vitro* plantlets using NMR. *In Vitro Cell. Dev. Plant*, 46: 41-46, 2010.
- DEWIR, Y.H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A.M.K. Micropropagation and detection of important triterpenes *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14): 3078-3083, 2011.
- DUKE, J. A. Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 52(3): 314-350. 1965.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.K. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35 (4): 961-965. 2005.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN-RODER, A.; NACHTIGAL, J.C. KERSTEN, E.; FORTES, G. *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.
- FARIA, J.E.Q.; GOMES-BEZERRA, K.M., ZANATTA, M.R.V., SILVA JÚNIOR, M.C.; SOARES-SILVA, L.H. *Myrcia macrocalyx* (Myrtaceae), a new species from Brazil, with additional morphological highlights. *Revista Phytotaxa*, 234(2): 179-185. 2015.
- FERREIRA, A.G.; BORGUETTHI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed. Porto Alegre. 2004
- GALVANESE, M.S. TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. *Revista Ceres*, Viçosa, 54(311): 63-67, 2007.

- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1 – The Tecnology. Edington: Exegenetics, 1996. 1574 p.
- GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; LEÓN, E.A.B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e meio nutritivo. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 22(1): 207-214, 2012.
- GOMES, G.A.C.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; SANTIAGO, É.J.A. Plant regeneration from callus culture of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, 39, (3): 293-295, 2003.
- GOMES, M.N.A.; SHEPHERD, S.L.K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 23(2): 153-159, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa- SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1, 183-260p.
- HE, S.S.; LIU, C.Z., SAXENA, P.K. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Sci. Hortic.* Amsterdam, 113: 82–86, 2007.
- HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. *Recent advances in plant in vitro culture*. 1st edition. InTech, Croatia, 2012. 210p.
- LABOURIAU, L. G. *A germinação das sementes*. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.
- LAVIOLA, B.G.; LIMA, P. A.; JÚNIOR, A.W.; MAURI, A.L.; VIANA, R.S.; LOPES, J.C. Efeito de diferentes substratos na germinação e no desenvolvimento inicial de jiloeiro (*Solanum gilo* RADDI), cultivar verde claro. *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, 30 (3): 415-421, 2006.
- LEDO, A.S.; SECA, G.S.; BARBOZA, S.B.S.C.; JUNIOR, J.F.S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 5(4): 989-993, 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000400007.
- LEITE, G.L.D.; VELOSO, R.V.S.; CASTRO, A.C.R.; LOPES, P.S.N.; FERNANDES, G.W. Effect of AIB on quality and phytosanitary of *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*) air layering. *Revista Árvore*, 31(2): 315-320, 2007.
- LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L.P. *Cultivo in vitro de plantas*. 3ª edição. ENBRAPA, Brasília, 2014.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proceedings of International Plant Propagation Society*, 30:421-427. 1980.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination and in selection and evaluation for emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1): 176-177. 1962.

- MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R.K. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. *Sci. Hort.*, 106: 539-553. 2005.
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R.; L. MOSSI, A. J. M. Disinfestation and micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Perspectiva*, Erechim. 35 (131): 69-77, 2011.
- MARTINELLI, G. ; MESSINA, T; FILHO, L.S. *Livro Vermelho da Flora do Brasil – Plantas Raras do Cerrado*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio- Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014. 320 p.
- MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A.A.N. Effect of scarification and light on *in vitro* seed germination of (*Eugenia dysenterica* DC.) *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 31(6): 1668-1671, 2007.
- MATSUMOTO, K.; COELHO, M. C. F.; MONTE, D. C.; TEIXEIRA, J. B. Sterilization of non-autoclavable vessels and culture Media by sodium hypochlorite for *In vitro* culture. *Acta Horticulturae*, Leuven, n. 839, p. 329-335, 2009.
- MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSING, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings, Portland:Discorides Press, 1988. V.2, 289-302p.
- MELO, B. Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.). 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- MELO, N.F.; OKASAKI, W.Y.; LEITA, C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 23(1): 102-107, 1999.
- MELO, J. T.; SILVIA, J. A.; TORRES, R. A. A.; SILVEIRA, C. E. S.; CALDAS, L. S. *Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado*. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds). Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, p.319-350, 2008.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C. C. J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 249-254, 1992.
- MERETI, M.; GRIGORIADOU, K.; NANOS, G.D. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Sci. Hortic. Amsterdam*, 93: 143– 148. 2002.
- MOREIRA, M.F.; VIEIRA, C.C.J.; ZAIDA, L.B.P. Efeito do fotoperíodo no crescimento em plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 22: 397-403. 1999.
- MURASHINGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497. 1962.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados nos desempenhos das plântulas. Editado por KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; NETO, J.B.F. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. 2.1-2.24p.

NASCIMENTO, A. da C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, 6 (2): 223–228, 2008.

NG, F.S.P. Strategies of establishment in Malayan forest trees. Editado por P.B., Tomilson, e M.H., Zimmerman. *Tropical trees as living systems*. Cambridge: Cambridge University Press, Pp. 129-162. 1978.

NICOLI, P.M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SANTANA, J.R.F.; SILVA, C.L.; SILVA, D.P.R.; PORTO, J.M.P. Adjustment of the process of micropropagation of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Ciência Rural*, 38: 685-689, 2008.

NOGUEIRA, R.C. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Rio de Janeiro, 33: 109-120, 2004.

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F., SILVA RIOS, M. N.; REZENDE, M. E. *Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria*. Recomendação técnica 41, Embrapa Cerrados, 4p. Brasília, 2001.

OLIVEIRA, M.C.; OGATA, R.S.; ANDRADE, G.A.; SANTOS, D.S.; SOUZA, R.M.; GUIMARAES, T.G.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; PEREIRA, D.J.; RIBEIRO, J.F. Manual de viveiro e produção de mudas: Espécies arbóreas nativas do Cerrado. Editora Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2016.

OLTRAMARI, A. C.; VESCO, L. L. D.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Ciência Rural*, Santa Maria, 30(1): 61-68, 2000.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83p.

PANDEY, S.; SINGH, M.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Shoot initiation and multiplication from a mature tree of *Terminalia arjuna* Roxb. *In vitro cell. Dev. Bio. Plant.*, 42: 389-393. 2006.

PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologias e aplicações: meios de cultura. 1º ed. Lavras, UFLA/FAEP, 74p. 2001.

PACHECO, M.V; MATOS, V.P.; FERREIRA, R.L.C.; FELICIANO, A.L.P.; PINTO, K.M.S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de

*Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*, 30(3): 359-367, 2006.

PEREIRA, A.R.; CARVALHO, S.P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. Acaiá Cerrado: Efeitos de cinetina e ácido giberélico. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 31(2): 332-336, 2007.

PEREIRA, A.M.S.; AMUI, S.F.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. *Planta Med*, 69: 571-573. 2003.

PEREIRA, J.; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semissólido e líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 11(38): 1273-1279, 2003.

PEREIRA, G.A. Uso do gene xylA – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 38f.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; LOPES, N.P.; PARON, M.E.; FRANÇA, S.C.; AMARANTES, V.S. *In vitro* propagation and germoplasm conservation of *Lychnophora ericoides* Mart: a medicinal species from the Brazilian cerrado. *Revista Fitos*, 1:69-73, 2005.

PEREIRA, G.A.; RIBEIRO, B.V.; MARCÍLIO, H.C.; SANTAELLA, M.B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira IAC 2001 em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, 3(2): 43-46, 2009.

PEREIRA, G.A.; CORREA, L.S.; 3, BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira “Grande Naine” em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, E: 222-226, 2011.

PINHAL, H.F.; ANASTÁCIO, M.R.; CARNEIRO, P.A.P.; SILA, V.J.; MORAIS, T.P.; LUIZ, J.M.Q. Aplicações de cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, 41(7):1136-1142, 2011.

PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants and *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(1): 29-38, 2009.

RIBEIRO, J.M.; PINTO, M.S.T.; TEIXEIRA, S.L. Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudanças *In Vitro*. Documentos online 256, Embrapa Semiárido Petrolina, PE, 2013. 24p.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1.209-1.213, 2008.

RIOS, M.N.S.; RIBEIRO, J.F.; REZENDE, M.E. Propagação Vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: *Cerrado, Caracterização e Recuperação de Matas de Galeria*, Embrapa, Brasília, 2001. 899p.

RIZINNI, C.T. Experimental studies on seedlings development of cerrado woody plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 52(3): 410–426, 1965.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Parte 1, Cap. 5, 134-164 p.

ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P. V.; NETTO, A. P. da C.; SOUZA, G. C. de; REIS, E. F. DOS; STEIN, V. C. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. *Plant Cell Cult. Micropropag.*, Lavras, 11(2): 70-77, 2015.

SANTOS, A.S.A.; MACHADO, I.S.; LEÃO, A.L.; RAMOS, A.A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. *Revista de Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, 8: 35, 2005.

SANTOS, B.R.; PAIVA R.; NOGUEIRA R. C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA D. P. C.; MARTINOTTO C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2): 293-296, 2006. Doi: 10.1590/S0100-29452006000200031.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposium of Society for Experimental Biology*, 11: 118-131, 1957.

SATHYANARAYANA, B.N., VARGHESE, D.B. Plant Tissue Culture. Practices and new experimental protocols. I.K. International Pvt Ltd. 2007. 316p.

SIDDIQUE, N.A.; BARI, M.A.; KHATUN, N.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.H.; HUDA, S. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (*Anantamul*) an endangered medicinal plant in Bangladesh. *J. Biol. Sci.*, 3: 1158-1163, 2003.

SILVA, F.A.B.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian archives of biology and technology*, 51(6): 1103-1114, 2008.

SILVA, J.B.C.; NAKAGAWA, J. Estudo de formulas para cálculo da velocidade de germinação. Informativo ABRATES, 5(1): 62-73, 1995.

SILVA, P.R.D.; RISPOLI, R.G.; MINOZZO, M.M.; JOBIM, L.H.; JUNGES, M.; STEFENON, V.M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. *Annals of Forest Research*, 57(1): 39-45, 2014. Doi: 10.15287/afr.2014.179.

SILVEIRA, C.E.S.; FUKUDA, W.S.; MIRANDA, T.D; PALHARES, D.; PEREIRA, L.A.R. *Jacaranda ulei* Bureau and K. Schum. (Bignoniaceae): *in vitro* seedling developmental study as contribution towards the domestication of this medicinal

Brazilian savannah species. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4): 85-89, 2013.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4): 1048-1053, 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000400016.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". *Ciência Rural*, Santa Maria, 36(6): 1920-1922, 2006a. Doi:10.1590/S010384782006000600041.

SOUZA, E.G.B.S.; SENA, L.H.M.; MATOS, V.P.; ALMEIDA, A.G.F. Desempenho germinativo de sementes crista de galo (*Celosia cristata* L.) sob diferentes substratos. In: Congresso Nordestino de Ecologia, 11., 2006. Recife: SNE, 2006b.

SOUZA, L.A. *Sementes e Plântulas: Germinação, estrutura e adaptação*. Ponta Grossa, PR: Toda palavra, 2009.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; DONINI, L.P.; RIBEIRO, M.F. Tipos de concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. *Ciência rural*, Santa Maria, 38(7): 2046-2048, 2008.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 9(4): 103-116, 2007.

SRIVASTAVA, N.; SHARMA, V.; DOBRIYAL, A. K.; KAMAL, B.; GUPTA, S.; JADON, V. S. Influence of Pre-Sowing Treatments on *in vitro* Seed Germination of Ativisha (*Aconitum heterophyllum* Wall) of Uttarakhand. *Biotechnology*, 10, 215-219. 2011.

STEIN V.C.; PAIVA, R.; RODRIGUES, M.; NOGUEIRA, G.; SOARES, F.P.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 723-725, 2007.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient médium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [Amsterdam], v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. *Ciência Florestal*, Santa Maria, RS, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

TERMIGNONI, R.R. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182 p.

THORPE, T.A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R.H. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. Academic Press, Third Edition. 2012. 188p.



TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998.

YADAV, U.; LAL, M.; JAISWAL, V.S. *In vitro* micropropagation of tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 21: 87-92. 1990.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Estabelecer protocolos de germinação e de micropropagação para *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae) e descrever a morfologia das fases iniciais de desenvolvimento dos indivíduos da espécie.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Descrever as características morfológicas do fruto, semente e plântula da espécie estudada;
- b. Avaliar diferentes substratos e procedimentos de cultivo *ex vitro* para produção de mudas de *Myrcia macrocalyx*;
- c. Avaliar diferentes reguladores de crescimento e procedimentos de micropropagação da espécie estudada.

**Capítulo 1.** O capítulo está escrito nas normas da Revista Botany (Ottawa Online) para futura tradução e submissão.

## **CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS DE *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae), ESPÉCIE RARA DO CERRADO COM POTENCIAL ORNAMENTAL**

Renata Uchôa Alves<sup>\*</sup>, Rafael Pereira Niemeyer<sup>2</sup>, Conceição Eneida dos Santos Silveira<sup>3</sup> & Lucia Helena Soares-Silva<sup>4</sup>. Universidade de Brasília - UnB.  
renata.uchoa.alves@gmail.com, rpniemeyer@gmail.com, alibertia.edulis@gmail.com e lselena71@gmail.com

### **Resumo**

A espécie *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva, descrita recentemente, é endêmica do Cerrado e, pela sua raridade e área de ocupação reduzida, enquadra-se na categoria “Em Perigo” de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN. O trabalho visou a caracterização morfológica de frutos, sementes e das plântulas e a verificação de melhores respostas de germinação da espécie em diferentes substratos. Plantas coletadas no município de Cavalcante (GO) foram utilizadas para as descrições morfológicas dos frutos e sementes (formato, cor, textura, brilho, peso, dimensões, número de sementes por fruto e espessura do pericarpo); peso da matéria fresca e seca e conteúdo de água. Para os testes de germinação foram utilizadas 100 sementes por tratamento (vermiculita, bioplant, areia e terra comum de cerrado). As bandejas com as sementes, dos diferentes tratamentos, foram mantidas em casa de vegetação e contabilizadas quando germinadas, no intervalo de 24h, durante 45 dias. Foi calculado: percentual de germinação, Índice de Velocidade de Emergência - IVE e Tempo Médio de Germinação - TMG. A plântula foi classificada morfológicamente. Verificou-se que o fruto é do tipo bacáceo com deiscência irregular com 1 a 3. A espécie apresenta melhores resultados de germinação no substrato vermiculita (87%), IVE (8,22) e TMG (13,52). A plântula é do tipo fanerocotiledonar, epígea com hipocótilo bem desenvolvido e emergência curvada.

**Palavras-chave:** *Myrcia*, fruto bacáceo, deiscência, fanerocotiledonar, epígea.

---

<sup>\*2</sup>Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília. <sup>34</sup>Docentes do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília. 70910-900, Brasília, DF, renata.uchoa.alves@gmail.com.

**GERMINATION AND MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF THE FRUITS,  
SEEDS AND SEEDLINGS OF *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva  
(Myrtaceae), A RARE, POTENTIALLY ORNAMENTAL SPECIES NATIVE TO  
THE CERRADO BIOME**

**Abstract**

*Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva, only recently described in scientific literature, is a species native to the Cerrado biome. Due to its rarity and to the small portion of land it covers, it is listed as an “endangered” species by International Union for Conservation of Nature - IUCN. This research aims to describe the morphology of its fruits, seeds and seedlings, as well as to identify the best germination responses within the species. For the morphological description of fruits and seeds (shape, color, texture, shine, weight, sizing, amount of seeds per fruit and pericarp width); wet and dry weights and water content, plants collected in the city of Cavalcante (GO) were used. A total of 100 seeds were used in each treatment technique (vermiculite, *Bioplant*, sand and earth) for the germination tests. The trays containing the seeds with each type of treatment were kept in a greenhouse and were counted upon germination, each 24 hours for 45 days. The parameters for calculations consisted of: germination percentage, Emergence Speed Index and Average Germination Time. Seedlings were morphologically described. Its fruits are bacaceous, irregular, dehiscent, containing 1 to 3 seeds in varying shapes. Best germination results for this species were seen in vermiculite (87%), ESI (8,22) and AGT (13,52). The seedlings are phanerocotylar, epigeal, with a well-developed hypocotyl and a curved emergence.

**Index terms:** *Myrcia*, fruit bacaceous, dehiscence, phanerocotylar, epigeal.

## Introdução

A família Myrtaceae é composta por duas subfamílias: Psyloxyloideae, com duas tribos, e Myrtoideae com 15 tribos. Myrteae é uma dessas e engloba todas as espécies neotropicais de Myrtaceae, em geral, com frutos carnosos indeiscentes, com exceção do gênero monoespecífico *Tepualia*, com ocorrência no Chile e Argentina e que pertence à Tribo Metrosidereae com frutos capsulares (Wilson et al., 2005).

A família Myrtaceae é considerada complexa do ponto de vista taxonômico, devido ao número elevado de espécies (Govaerts et al., 2017), à grande similaridade morfológica entre gêneros e à utilização de características crípticas na caracterização de tais grupos (Macvaugh, 1963; Soares-Silva, 2000), principalmente na tribo Myrteae.

O gênero *Myrcia* se destaca em número de espécies, compreendendo 418 táxons específicos registrados (Govaerts et al., 2017). Destes, 260 ocorrem no Brasil (Sobral et al., 2015), com registro em todos os biomas brasileiros. A espécie *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva, descrita recentemente (Faria et al., 2015), é endêmica do estado de Goiás, com registro de ocorrência apenas para o município de Cavalcante. É uma espécie sub-arbustiva de Campo limpo e sujo e, pela sua raridade (poucas populações conhecidas) e área de ocupação reduzida (16 km<sup>2</sup>), enquadra-se na categoria “Em Perigo” de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN category EN), mesmo critério adotado no *Livro Vermelho da Flora do Brasil – Plantas Raras do Cerrado* (Martinelli et al., 2014). Apesar de as populações conhecidas estarem nas vizinhanças do Parque Nacional Chapada dos Veadeiros, não há registro de coleta da espécie nessa unidade de conservação, aumentando, ainda mais, o risco de extinção.

Para retirar as espécies do estado de ameaçadas da IUCN, é preciso estimular o uso racional da vegetação nativa como, por exemplo, a utilização de sementes – unidades responsáveis pela perpetuação das espécies vegetais (Rede de Sementes do Cerrado,

2011). O aproveitamento de sementes para produção de mudas depende da eficácia no processo de cultivo e, conseqüentemente, da germinação e conhecimento das características dos frutos e sementes das espécies em risco.

Reconhecer a morfologia de frutos e sementes representa papel importante na verificação da qualidade dos mesmos (Oliveira e Pereira, 1984), além de fornecer informações para trabalhos de armazenamento, conservação, semeadura e produção de mudas. Também é fundamental para interpretações em testes de germinação e avaliação do vigor das plântulas (Araújo e Matos, 1991; Amorim et al., 2006); entendimento de processos de regeneração e sucessão ecológica (Araújo Neto et al., 2002; Barreto et al., 2011) compreensão do estabelecimento das plântulas no ambiente natural (Donadio e Dematte, 2000; Abreu et al., 2005; Guerra et al., 2006; Amorim et al., 2008).

O conhecimento da biologia da germinação e armazenamento de sementes é essencial para o desenvolvimento de ferramentas capazes de promover a conservação (El-Kassaby e Edwards, 1998). A germinação é um processo crítico na ontogênese das espécies vegetais (Labouriau, 1983), uma vez que depende de fatores bióticos da semente, oriundos da planta mãe, e abióticos, dentre os quais se destacam água, luz, temperatura, oxigênio e o substrato (Baskin e Baskin, 1998), que pode favorecer ou prejudicar o processo de germinação de acordo com as suas características – grau de aeração, estrutura, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos (Popinigis, 1985). Essas características, combinadas com as necessidades das espécies, desencadeiam diferentes resultados no cultivo e produção de mudas (Laviola et al., 2006).

Vale et al. (2004) destacam que o substrato é fundamental na produção de mudas de qualidade, visto que promove o suporte da planta (Fermino, 1996; Kampf, 2000), disponibiliza e regula a quantidade de nutrientes (Kampf, 2000; Vale et al., 2004), água

(Fonteno, 1996) e influencia tanto a germinação quanto o desenvolvimento das plântulas (Tonin e Perez, 2006). O substrato ideal deve ter a capacidade de reter água suficiente para assegurar a umidade nas sementes, conter porosidade ideal que permita boa aeração e ser isento de patógenos que possam interferir no crescimento ou vigor das plântulas (Brasil, 2009).

Entender como acontece a germinação e o desenvolvimento da plântula é fundamental para explicar a ocorrência das espécies em determinados locais (Labouriau, 1983; Áquila e Ferreira, 1984) e fornecer subsídios para estudos de produção de mudas nativas e, conseqüentemente, conservação dessas espécies por meio da reintrodução no habitat natural (Labouriau, 1983). Acompanhar o desenvolvimento das plântulas reconhecendo seus caracteres morfológicos possibilita a classificação e identificação de espécies do mesmo gênero; reconhecimento da planta em campo e indicações sobre armazenamento de sementes e cultivo das espécies (Abreu et al., 2005).

Atualmente existe um fortalecimento de políticas ambientais que promovem a demanda em busca de sementes de espécies nativas, visto que a ação permite a execução de programas de conservação (Carvalho et al., 2006). Dentro desta perspectiva, a Instrução Normativa n° 6 instruiu, em seu Art. 5º, que fossem elaborados e implementados planos de ação para a retirada de espécies das listas vermelhas no prazo máximo de cinco anos, a contar da data de sua publicação (Brasil, 2008). O prazo se esgotou em 2013, justamente no ano de publicação do *Livro Vermelho da Flora do Brasil* e, ao invés de um plano de ação para essas espécies, obteve-se uma listagem ainda mais preocupante sobre uma iminente perda de biodiversidade brasileira.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente os frutos, sementes e plântulas de *Myrcia macrocalyx* e verificar as melhores respostas de germinação dessa espécie ameaçada do bioma Cerrado.

## **Materiais e Métodos**

Coletas férteis (com flores, frutos e sementes) de *Myrcia macrocalyx* foram feitas no município de Cavalcante – GO, na margem esquerda da estrada, sentido Sítio dos Kalungas, em uma área de campo sujo do Cerrado (13°36'26.3''S 47°28'24.3''W em 2016). Uma amostra testemunha foi depositada no Herbário UB, da Universidade de Brasília – Alves, R.U. et al. 1 (UB). Os frutos, na ocasião das coletas, apresentavam o pericarpo íntegro. Foram feitos registros fotográficos em campo com uma câmera Canon PowerShot SD960IS. As análises dos frutos e sementes foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Casa de Vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas – CRAD/UnB.

*Morfologia de frutos e sementes* – Para as descrições morfológicas, foram utilizados 100 frutos e 100 sementes escolhidos, aleatoriamente, do montante coletado. Os caracteres analisados foram: formato, cor, textura, brilho, peso, dimensões (comprimento e largura), número de sementes por fruto e espessura do pericarpo. Os frutos foram abertos com auxílio de bisturi e pinça de ponta fina, com cuidado para não danificar a testa das sementes. As danificadas foram desprezadas. As sementes foram acondicionadas em sacos de papel kraft e armazenadas sob temperatura entre 6° e 10°C em refrigerador. As observações foram feitas a olho nu e com auxílio de lupa de mesa. As medições foram feitas com paquímetro manual de 0,05mm de precisão; paquímetro digital e a pesagem feita em balança de precisão (0,001g). A metodologia adotada para a descrição dos frutos e sementes foi baseada nos trabalhos de Abreu et al. (2005); Añez et al. (2005) e Almeida Jr. et al. (2010). Foi realizado o registro fotográfico das estruturas durante as análises, utilizando câmera Nikon D3100 e as imagens foram tratadas digitalmente, por meio do programa Photoshop. A análise dos dados foi do tipo



descritiva (mínimo, máximo, média e desvio padrão) utilizando o programa RStudio versão 0.99.903, 2009-2016.

*Peso da matéria fresca, seca e conteúdo de água das sementes* – para a verificação do peso da matéria fresca, seca e conteúdo de água das sementes foram adotadas as recomendações presentes nas “*Regras para análise de sementes*” (Brasil, 2009), que consistem em pesar 50 sementes frescas, individualmente, visando obter a média do peso da matéria fresca das sementes e, posteriormente, colocá-las em estufa sem ventilação forçada, sob à temperatura de 100 °C para secagem. Os lotes foram pesados em intervalos de 24h até que atingissem o peso constante, momento em que as sementes foram pesadas novamente separadamente para obter a média de seu peso seco. Os resultados do conteúdo de água foram expressos em porcentagem (%), sendo o conteúdo de água a relação entre o peso da água presente na semente seca e a massa total da semente fresca.

*Germinação* - Após a coleta, os frutos foram despulpados com auxílio de pinça e bisturi e as sementes foram acondicionadas, por uma semana, em embalagens de polietileno e armazenadas em geladeira, em temperatura entre 6 °C a 10 °C, até serem semeadas. A seleção da temperatura e forma de armazenamento foi baseada nos resultados obtidos por Andrade e Ferreira (2000), Maluf et al. (2003) e Kohaman et al. (2006) em manter a longevidade de sementes de espécies da mesma família. Para os experimentos de germinação foram utilizadas 400 sementes selecionadas aleatoriamente no montante coletado. Utilizou-se 100 sementes por tratamento, sendo considerado como tratamento cada um dos diferentes substratos – vermiculita de granulometria média, areia lavada, Bioplant (substrato comercial) e terra comum de cerrado coletada superficialmente, no

próprio CRAD/UnB, sendo este solo classificado como latossolo vermelho do horizonte B, dispostas em bandejas de isopor. O delineamento experimental foi uni fatorial (1x4), no qual os quatro tratamentos foram referidos como fatores. Todos os tratamentos foram submetidos às mesmas condições na casa de vegetação - temperatura e luminosidade não controlada (sombrite de 50%), com fornecimento de água de irrigação por aspersão e vazão uma vez por dia com duração de 20 minutos. O percentual de germinação foi calculado após 45 dias da semeadura, adotando o critério de germinação de Labouriau (1983) e Souza (2009), utilizando a fórmula:  $G=(N/100) \times 100$ , em que: N=número de sementes germinadas ao final do teste e o resultado foi expresso em porcentagem (%) (Ferreira e Borghetti 2004).

*Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e Tempo Médio de Germinação (TMG) -* Utilizou-se o mesmo material dos testes de germinação para verificação do IVE e TMG. Para calcular o IVE, as sementeiras, contendo 100 sementes por tratamento, foram contabilizadas no intervalo de 24h, durante 45 dias, adotando-se a metodologia recomendada por Maguire (1962):  $IVE = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$ . Onde: IVE = índice de velocidade de emergência; E1, E2,... En = número de plântulas computadas na primeira, segunda e última contagem respectivamente; N1, N2,... Nn = número de dias da semeadura. Para o cálculo do TMG adotou-se a fórmula determinada por Silva e Nakagawa (1995):  $TMG = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$ , em que:  $n_i$  = número de sementes germinadas por dia;  $t_i$  = tempo de incubação;  $i = 1 \rightarrow 45$  dias. Unidade: dias.

*Classificação da germinação -* Ao longo dos testes de germinação, as sementes foram observadas, diariamente, para o acompanhamento do desenvolvimento das plântulas e classificação nos tipos: fanerocotiledonar/criptocotiledonar e epígea/hipógea. As

definições adotadas estão de acordo com Souza (2009).

*Morfologia descritiva das plântulas* – As descrições morfológicas e registro dos caracteres foram realizadas no final do experimento (45 dias), utilizando 40 plântulas de cada tratamento (areia, bioplant, terra e vermiculita) que se apresentavam mais vigorosas. Os registros ilustrativos foram feitos com máquina fotográfica Nikon D3100. Utilizando régua graduada em milímetros e paquímetro digital (mm), as plântulas foram medidas do ápice até a ponta da raiz após a retirada do substrato. Foram analisados também: raiz (tipo, forma, comprimento, largura e coloração), hipocótilo e epicótilo (forma, pilosidade, comprimento, largura, e coloração), cotilédones e eófilos [forma, textura, nervação, coloração, tipo de bordo, ápice, base e dimensões (altura e largura)], conforme metodologia adaptada de Rego et al. (2010). Os conceitos morfológicos estão de acordo com Souza (2003) e Souza (2009). E classificações das plântulas de acordo com Duke (1965); Rizzini (1965) e NG (1978).

Os indivíduos foram considerados em fase de plântula quando os primeiros eófilos encontravam-se totalmente formados e distendidos e a fase de tirodendro quando o primeiro metafilo estava completamente formado (Souza, 2009). Para avaliação estatística foi feita a análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (5%), por meio do programa RStudio versão 0.99.903, 2009-2016.

*Análise de matéria fresca, seca e conteúdo de água das plântulas* - As 160 plântulas utilizadas na descrição morfológica foram pesadas em balança de precisão de 0,001g, determinando o peso da matéria fresca. Após este momento, as plântulas foram colocadas em sacos de papel kraft e identificadas conforme os lotes (tratamentos) e acondicionadas em estufa, com circulação de ar, à temperatura de 80°C e mantidas até

atingir o peso constante. As avaliações ocorreram em intervalos de 24 horas e todas as plântulas foram pesadas individualmente. A análise foi feita a partir da comparação entre a média do peso da matéria fresca e seca das plântulas nos diferentes tratamentos e o conteúdo de água, expresso em porcentagem (%), sendo o teor de água equivalente à diferença entre o peso da plântula fresca e seca. Todos os cálculos foram feitos por meio do programa Excel.

## **Resultados**

As observações em campo mostraram que a espécie apresenta propagação vegetativa, estando os indivíduos ligados sob o solo por um sistema subterrâneo. Faria et al. (2015) afirmam que a espécie é detentora de xylopodio, porém as observações de campo não são suficientes para afirmar se os indivíduos encontram-se ligados pela raiz ou pelo xylopodio. O fruto de *Myrcia macrocalyx* é do tipo bacáceo. A coloração varia de verde a roxo, quando maduro. São encontradas de 1 a 3 sementes por fruto e a forma da semente está relacionada com o número de sementes no fruto (Figura 1).

Frutos com uma só semente foram mais representativos na amostra coletada, representando 46% da amostra, seguidos por frutos com duas sementes, que representam 42% e com três sementes, 12%. Os frutos apresentam, entre si, intensa variabilidade biométrica (Tabela 1).

O fruto quando imaturo passa pelas colorações: verde-claro, amarelo, vermelho, vinho até atingir a cor arroxeadada. O mesocarpo é carnoso, com polpa escassa, quase nula (Tabela 1), de coloração branca à leitosa, quase transparente. E quando maduro apresenta-se arroxeadado, liso, glabro, brilhante e sem odor. O pericarpo maduro resseca e se rompe apresentando uma deiscência irregular, que expõe as sementes no ambiente (Figura 1 – A, B e D).



— : 1,0 cm

**Figura 1:** *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae). Flor e frutos, com o pericarpo ressecado expondo as sementes. A – Fruto com uma semente; B - Fruto com duas sementes; C – Flor aberta; D – Fruto com uma semente mostrando a porção do endocarpo.

**Tabela 1:** Biometria dos frutos de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva coletados no município de Cavalcante - GO.

	Compr. c/ sépala (cm)	Compr. s/ sépala (cm)	Largura (cm)	Espessura do pericarpo (mm)	Peso fresco (g)
<b>Mínimo</b>	1.00	0.70	0.70	0.16	0.20
<b>Máximo</b>	2.20	2.00	1.80	1.75	1.03
<b>Média</b>	1.56	0.99	0.96	0.59	0.50
<b>Desvio padrão</b>	0.23	0.17	0.17	0.32	0.15

Abreviações: Comp. – Comprimento; c/ - com; s/ - sem. (n=100).

Nos frutos monospérmicos, a semente mostra-se globosa, como o fruto; nos bispérmicos, as sementes apresentam-se plano-convexas, enquanto nos frutos com três

ou mais sementes, estas apresentam-se quinadas com a porção externa convexa (Figura 3).

A testa da semente apresenta coloração que varia em tons de castanho, com textura lisa, glabra e brilhante quando madura. As sementes variam em tamanho (comprimento 0,4 – 1,7 cm), peso da matéria fresca (0,04 – 0,6 g). O conteúdo de água presente, na semente é de, ca., 50% de seu peso fresco (Tabela 2).

**Tabela 2:** Biometria das sementes de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva coletadas no município de Cavalcante - GO.

	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Largura (cm)</b>	<b>Peso fresco (g)</b>	<b>Peso seco (g)</b>	<b>Água (%)</b>
<b>Mínimo</b>	0.40	0.30	0.04	0.04	0.00
<b>Máximo</b>	1.70	1.00	0.60	0.19	81.82
<b>Média</b>	0.86	0.73	0.23	0.09	51.46
<b>Desvio padrão</b>	0.16	0.15	0.11	0.03	19.95

(n=100).

As sementes iniciaram a emergência a partir do 2º dia após a semeadura no substrato vermiculita, enquanto nos demais tratamentos a emergência se iniciou no 4º e no 5º dia após a semeadura em Bioplant e areia, respectivamente. Embora a emergência de algumas sementes tenha iniciado poucos dias após a semeadura, ao final do experimento, aos 45 dias, sementes presentes no substrato areia ainda estavam emergindo do solo.

As melhores porcentagens de germinação foram de 87% nos substratos vermiculita e areia. O maior IVE foi encontrado no substrato vermiculita (8,22) seguido pelo Bioplant (7,53) e areia (7,03), enquanto no substrato terra (3,09) esse índice foi inferior (Tabela 3).

**Tabela 3:** Porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Emergência – IVE e Tempo Médio de Germinação – TMG de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva em diferentes tratamentos em casa de vegetação, obtidos aos 45 dias após a semeadura.

Tratamentos	Germinação (%)	IVE (dias)	TMG (dias)
Areia	87	7,03	17,89
Bioplant	86	7,53	15,64
Terra	48	3,09	22,35
Vermiculita	87	8,22	13,52

(n=100).

Na análise biométrica das plântulas aos 45 dias, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, em relação ao comprimento do hipocótilo, a largura da raiz e o número de raízes laterais. As plântulas que atingiram maior comprimento aos 45 dias se encontravam nos substratos Bioplant e vermiculita, embora não exista diferença significativa entre esses tratamentos. Os demais caracteres apresentaram resultados similares em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com terra do Cerrado, com menores médias (Tabela 4).

A plântula de *Myrcia macrocalyx* é do tipo fanerocotiledonar e epígea, com emergência curvada do hipocótilo. Os cotilédones se encontram livres do envoltório das sementes e o hipocótilo, bem desenvolvido, se estendem expondo os cotilédones acima do substrato. A distensão completa dos cotilédones ocorreu antes e depois da distensão do hipocótilo, fato que foi observado por volta do 15º a 20º dia após a semeadura.

O desenvolvimento da plântula iniciou a partir do eixo hipocótilo-radicular, dando origem à raiz primária. O sistema radicular é do tipo axial/pivotante, róseo-claro no início do desenvolvimento, passando para castanho. Mais da metade dos indivíduos (56,5%) apresentavam raízes secundárias aos 45 dias pós semeadura/inoculação.

A região do coleto é bem definida em relação ao diâmetro e coloração (Tabela 2 e Figura 3). O hipocótilo, inicialmente curvo, se desdobra, ficando ereto; glabro, medianamente espesso, cilíndrico e de coloração inicialmente verde, passando a vinho-arroxeadado (Figura 2 e 3). O hipocótilo é bem desenvolvido, podendo chegar a 3 cm de

comprimento em plantas germinadas em areia confirmando a classificação como epígea (Tabela 5).

**Tabela 4:** Caracteres morfológicos de plântulas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva, cultivadas aos 45 dias, em diferentes substratos.

Substrato	Comp. Plant.*	Comp. Epi.*	Comp. Raiz*	Comp. Cot.*	Larg. Cot.*	Comp. Eo.*	Larg. Hip.**	Larg. Col.**
Areia	7.12 b	0.44 a	3.80 ab	1.19 a	1.61 a	0.66 b	1.02 b	1.71 a
Bioplant	7.75 ab	0.47 a	4.38 a	1.23 a	1.60 a	1.10 a	0.98 b	1.47 ab
Terra	5.49 c	0.09 b	2.77 b	0.76 b	0.96 b	0.18 c	1.11 b	1.53 ab
Vermiculita	7.61 ab	0.44 a	4.41 a	1.14 a	1.50 a	0.74 b	0.98 b	1.28 b

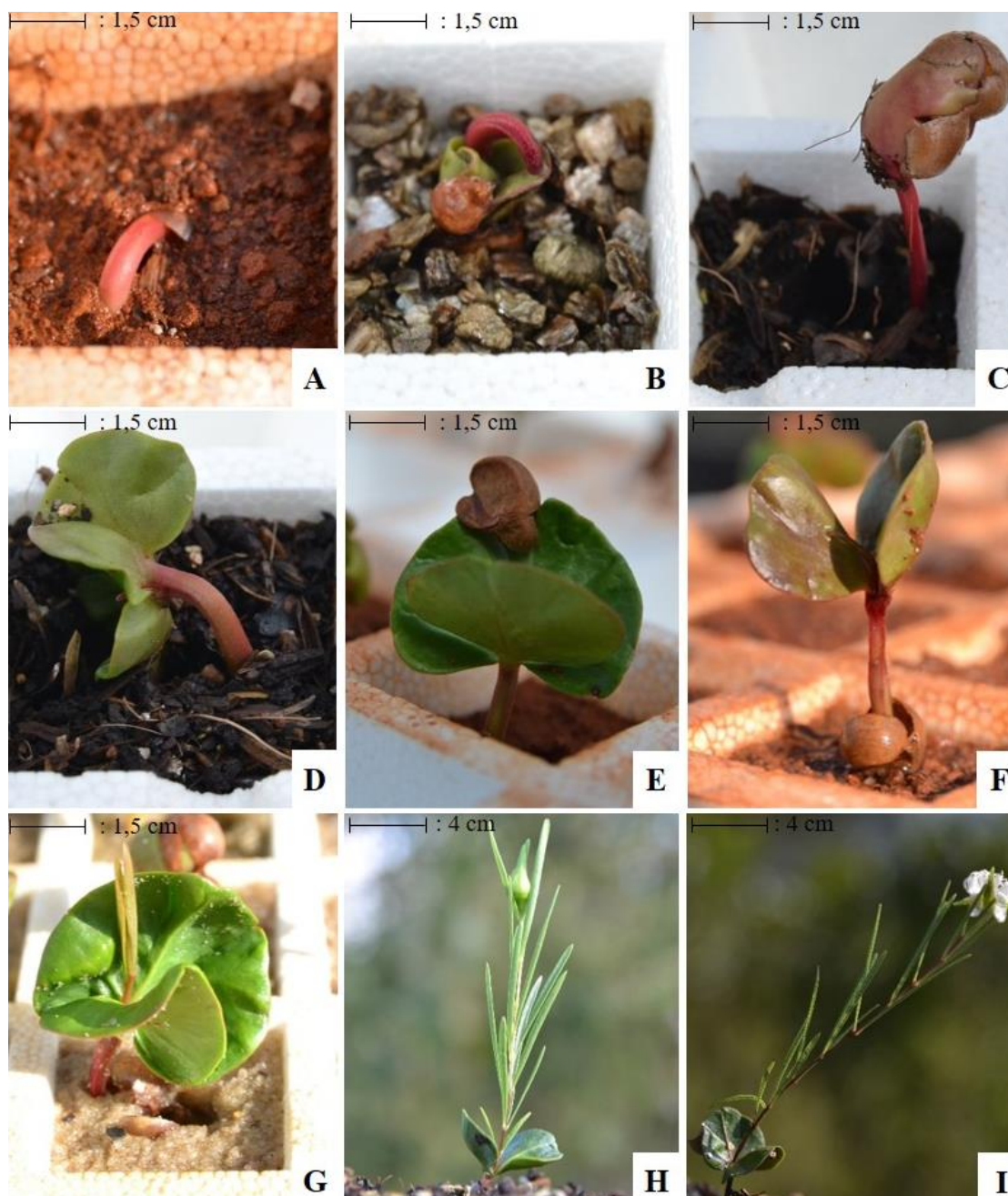
**Abreviações:** Comp. – Comprimento; Plant. – Plântula; Larg. – Largura; Epi – Epicótilo; Cot – Cotilédone; Eo – Eofilo; Hip – Hipocótilo; Col – Coleto. **Simbolos:** \* - cm; \*\* - mm. Resultados seguidos pelas mesmas letras, na mesma coluna ou linha, são estatisticamente similares e foram calculados pelo teste T ( $p = 0,05$ ).

Os cotilédones são cordiformes, opostos, com ápice foliar obtuso e retuso com margem sinuosa próxima ao ápice e base cordada. O órgão laminar é coriáceo com pontuações aparentes, glabro, com venação pinado-broquidódroma, face adaxial verde escuro brilhante e abaxial verde-claro.

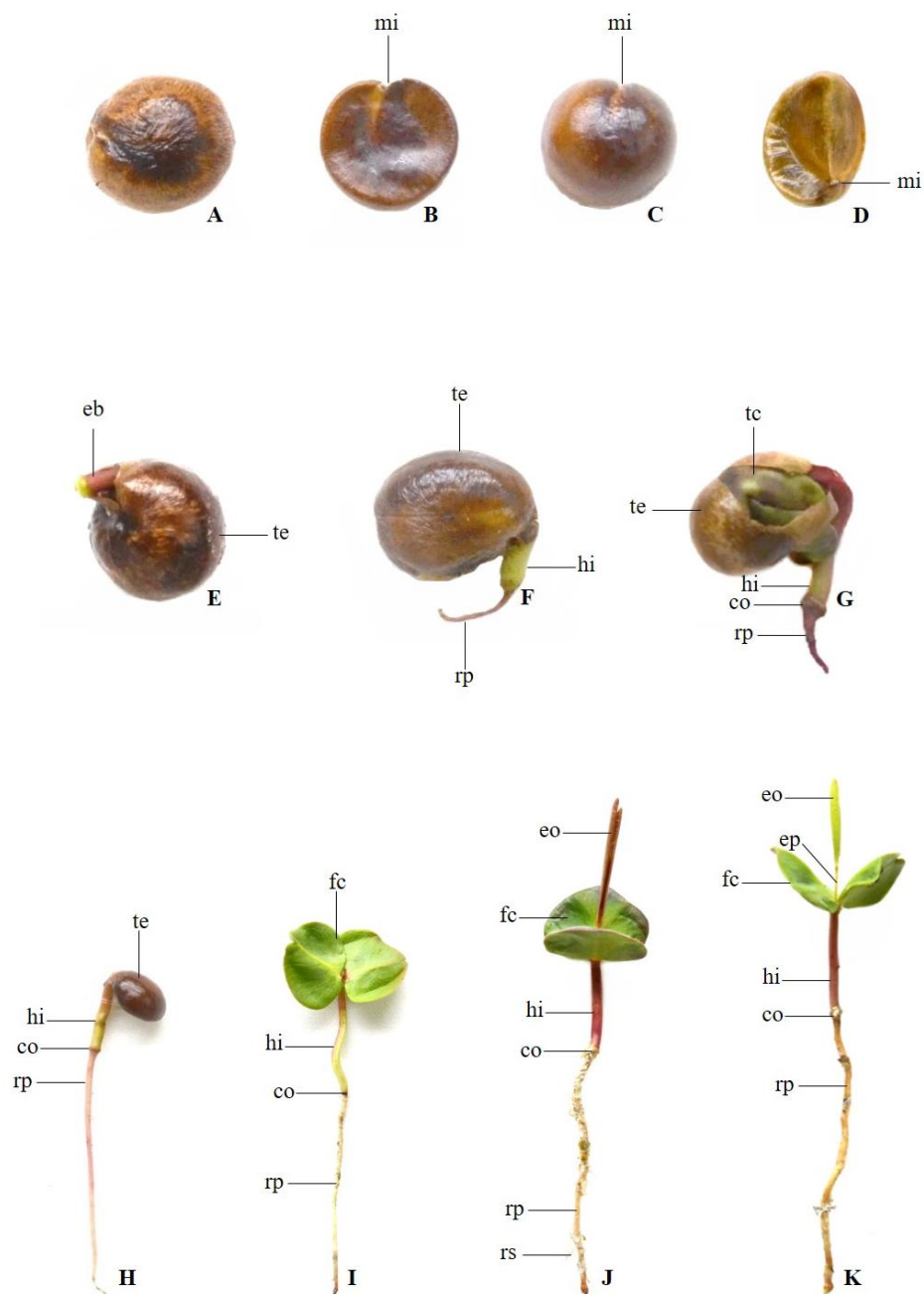
O eofilo é oposto, agudo apiculado, linear a lanceolado, de 0,2 à 2,5 cm x 0,1 a 0,4 cm, o ápice arredondado e base aguda, margem inteira, glabra e venação pinado-broquidódroma. A nervura é marcante sendo mais clara que a lâmina. A coloração inicial é roxa passando a verde conforme se desenvolve e se distende.

Entre 45 e 50 dias algumas plântulas já apresentam mais de um par de eofilo formado, mas não se pode afirmar que esses indivíduos já se encontram em fase de tirodendro, uma vez que não se pode distinguir morfológicamente os eofilos dos metafilos (visualizados em campo). Após 6 meses de semeadura, 5 indivíduos apresentavam botões florais e 2 já estavam com as flores abertas (Figura 2 - H e I).





**Figura 2:** Desenvolvimento de plântulas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva germinadas em diferentes substratos em casa de vegetação. A - Emissão do hipocótilo acima do substrato terra após 6 dias; B – Hipocótilo curvo emergindo do substrato vermiculita e distendendo os cotilédones com 10 dias; C - Plântula com 17 dias com o hipocótilo distendido e cotilédones dobrados protegidos por parte da testa da semente em bioplastic; D – Plântula de 15 dias desdobrando o hipocótilo e distendendo os cotilédones sem a testa da semente, em bioplastic; E - Plântula com 20 dias com testa da semente se desprendendo dos cotilédones em terra; F - Plântula com o hipocótilo ereto e cotilédones distendidos em terra; G - Plântula de 22 dias com eófilos formados porém ainda unidos no substrato areia; H – Plântula com 6 meses, apresentando botão floral em vermiculita; I - Plântula com 6 meses com flor aberta em bioplastic. Fotos de Gilberto Alves.



— : 0,45 cm

**Figura 3:** Sementes e fases sucessivas de desenvolvimento da plântula de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva germinadas no substrato vermiculita. A - Semente única com formato globoso similar ao fruto; B e C - Sementes plano-convexas, oriundas de um mesmo fruto; D - Semente mostrando a porção quinada, oriunda de fruto com 3 sementes; E - Início do processo de germinação a partir do eixo hipocótilo-radicular; F - Desenvolvimento e espessamento da raiz e do hipocótilo; G - Rompimento da testa da semente expondo as folhas cotiledonares dobradas; H - Plântula com alongamento da raiz primária e hipocótilo; I - Plântula após a distensão dos cotilédones e liberação da testa que as envolvia; J - Surgimento do eofilo de cor roxa; K - Plântula com o eofilo desenvolvido com coloração verde. Fotos de Gilberto Alves. **Abreviações:** mi - micrópila ;eb - eixo embrionário; te - testa da semente; , hi - hipocótilo; tc - tecido cotiledonar; rp - raiz primaria; te - tecido embrionário; co - coleto; fc - folha cotiledonar; eo - eofilo; ep - epicótilo; rs - raiz secundária; eo - primeiro eofilo.

**Tabela 5:** Caracteres morfométricos das plântulas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva com 45 dias após a semeadura em diferentes tratamentos.

	Compr. (cm)	Hipocótilo		Epicótilo	Coletó	Raiz		Cotilédone		Eofilo	Quant.	Folha		Peso Fresco	Peso Seco
		Compr. (cm)	Larg. (mm)	Compr. (cm)	Diam. (mm)	Compr. (cm)	Larg. (mm)	Compr. (cm)	Larg. (cm)	Compr. (cm)		Compr. (cm)	Larg. (cm)		
Mínimo															
Areia	5,40	1,00	0,10	0,10	0,20	2,00	0,10	0,70	1,10	0,30	0,00	1,00	0,10	0,08	0,03
Bioplant	4,50	0,50	0,02	0,10	0,03	3,50	0,01	0,80	1,00	0,10	0,00	1,00	0,10	0,50	0,02
Terra	1,30	0,50	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,50	1,00	0,30	0,00	1,00	0,10	0,05	0,02
Vermiculita	5,80	1,00	0,01	0,10	0,02	3,00	0,01	0,90	1,10	0,10	0,00	0,70	0,10	0,09	0,04
Máximo															
Areia	9,00	3,00	0,07	1,10	0,01	5,00	0,04	2,10	2,80	1,50	4,00	2,00	0,30	0,61	0,22
Bioplant	9,60	2,50	0,05	1,80	0,07	5,20	0,28	1,60	2,30	2,50	2,00	2,00	0,50	0,34	0,13
Terra	8,10	2,50	0,07	1,00	0,06	4,80	0,04	1,80	2,00	1,30	2,00	1,00	0,10	0,30	0,13
Vermiculita	9,50	2,30	0,42	1,00	0,07	5,10	0,17	1,50	2,10	1,70	4,00	2,00	0,20	0,31	0,12
Média															
Areia	7,12	1,64	0,04	0,43	0,06	3,80	0,02	1,19	1,61	0,66	0,55	0,35	0,03	0,22	0,09
Bioplant	7,75	1,66	0,03	0,40	0,08	4,38	0,03	1,22	1,60	1,10	0,80	0,65	0,05	0,18	0,07
Terra	5,49	1,56	0,04	0,09	0,07	2,76	0,02	0,75	0,96	0,17	0,05	0,02	0,02	0,17	0,06
Vermiculita	7,61	1,48	0,04	0,44	0,05	4,41	0,02	1,13	1,50	0,74	0,75	0,41	0,04	0,17	0,07
Desvio Padrão															
Areia	0,76	0,50	0,01	0,29	0,01	0,60	0,08	0,24	0,40	0,42	1,10	0,67	0,07	0,10	0,03
Bioplant	0,97	0,40	0,01	0,35	0,12	0,43	0,05	0,17	0,30	0,65	0,99	0,83	0,07	0,05	0,02
Terra	1,82	0,46	0,01	0,19	0,09	1,45	0,01	0,56	0,68	0,35	0,31	0,15	0,15	0,67	0,02
Vermiculita	0,80	0,32	0,06	0,02	0,01	0,40	0,02	0,18	0,26	0,46	1,08	0,62	0,06	0,05	0,02

**Abreviações:** Comp. – Comprimento; Larg. – Largura; Diam. – Diâmetro; Quant. – Quantidade.

## Discussão

Fruto do tipo bacáceo como o de *Myrcia macrocalyx* é caracterizado por Barroso et al. (1999) como um fruto carnosos de pericarpo escasso e pouca polpa. O escurecimento e ressecamento do pericarpo acarretando uma deiscência irregular pode ser consequência da perda de água ou atividade de enzimas oxidativas presentes nos tecidos (Silva et al., 2010). Não existe registro de frutos carnosos deiscentes em *Myrcia* como na espécie em questão. Também não foram encontrados frutos com 4 sementes, embora Faria et al. (2015) tenham registrado que sejam comuns na espécie.

O conteúdo de água presente nas sementes da espécie estudada foi superior a 50% de seu peso de matéria fresca, sendo este um percentual superior ao encontrado por Leonhardt et al. (2010) para as espécies congêneres *Myrcia glabra* (O. Berg.) D. Legrand (47,7%) e *Myrcia palustris* DC. (valores que variam de 40,7% a 46,2%). Algumas espécies do gênero *Eugenia* apresentam teor de água elevado (entre 40% e 70%) e são consideradas sensíveis à dessecação (Barbedo et al., 1998; Anjos e Ferraz, 1999; Andrade e Ferreira, 2000; Andrade et al., 2003). Castro et al. (2004) relatam que sementes ortodoxas apresentam um baixo conteúdo de água, entre 5% e 10%, e sementes recalcitrantes um alto conteúdo de água, por volta de 60% a 70% de seu peso fresco. As ortodoxas são capazes de se manter viáveis após a desidratação e/ou baixas temperaturas e as recalcitrantes são incapazes de suportar essas pressões (Roberts, 1973). Dentro desta perspectiva, a espécie pode ser classificada como “intermediária”, definida por Ellis et al. (1990), como sementes sensíveis ou à desidratação ou à temperaturas baixas.

Em relação ao início do processo de emergência das sementes, o resultado obtido é considerado rápido segundo padrões de Ng (1978) e resultado semelhante foi obtido por Ferreira et al. (2013) para *Myrcia cuprea* (O. Berg) Kiaersk. Embora a germinação

de algumas sementes tenha se iniciado poucos dias após a semeadura, ao final do experimento, aos 45 dias, sementes presentes no substrato areia ainda estavam emergindo do solo. Segundo Andrade e Ferreira (2000), a diferença de porcentagem e tempo médio de emergência das plântulas pode ser explicado pela desuniformidade das sementes, fato que foi observado no experimento de germinação considerando a massa das sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. no qual as sementes de tamanho intermediário apresentaram um melhor desempenho germinativo em menor tempo. O mesmo pode ter ocorrido com a *Myrcia macrocalyx*, uma vez que a espécie também apresenta variedade biométrica e diferenças entre o tempo médio de germinação (Tabela 3). Ng (1978) discutiu ainda a eficácia da germinação rápida e uniforme em ambiente natural, uma vez que as plântulas competem entre si e estariam suscetíveis a ataques de predadores e muitas vezes não possuem um estoque de sementes no solo.

Fanti e Perez (1999) afirmam que a obtenção de mudas nativas está ligada à escolha do substrato que permita o bom desenvolvimento das plântulas e, para isso, é preciso levar em consideração o tamanho das sementes e as necessidades fisiológicas das mesmas. Segundo Borghetti e Ferreira (2004), sementes de uma mesma espécie podem apresentar diferentes resultados de germinação dependendo do substrato recebido. Tal situação ocorreu no presente experimento, no qual as sementes de *Myrcia macrocalyx* condicionadas aos tratamentos areia, Bioplant e vermiculita apresentaram germeabilidade superior a 85%, enquanto que no tratamento com o substrato terra, a mesma espécie apresentou porcentagem inferior a 50% (Tabela 3). Os mesmos autores afirmam que germeabilidade abaixo de 100% pode indicar dormência ou inviabilidade das sementes, embora as condições dos experimentos também possam ter condicionado esses resultados.

As melhores porcentagens de germinação obtidas no presente estudo foi de 87%

nos substratos vermiculita e areia, superando a encontrada por Leonhardt et al. (2010) para *Myrcia glabra* (O. Berg.) D. Legrand (80%) e igualando ao resultado obtido pelos mesmos autores para *Myrcia palustris* DC. (87%), quando germinadas em gerbox contendo areia (Tabela 3). O resultado encontrado no substrato vermiculita difere do descrito por Ferreira et al. (2013) para *Myrcia cuprea* (O. Berg) Kiaersk., que apresentou o pior resultado quando germinada em vermiculita e o melhor resultado quando germinada em solo de restinga, local de ocorrência da espécie. Tal diferença pode ser justificada pela divergência de áreas de ocorrência entre as espécies e, consequentemente, das características do solo dessas regiões. E ainda por questões fisiológicas das próprias espécies.

O maior IVE foi encontrado no substrato vermiculita (8,22) seguido pelo Bioplant (7,53) e areia (7,03), enquanto em terra (3,09) esse índice foi inferior (Tabela 3). Nakagawa (1999) afirma que uma maior velocidade de emergência permite inferir em maior vigor do lote de sementes oriundas do tratamento ao qual foram submetidas, nesse sentido, a maior velocidade por sugerir uma melhor vigorosidade do lote de sementes.

O início da fase de plântula da *Myrcia macrocalyx* é o padrão comum para as Magnoliopsida segundo Souza (2009). O resultado observado de um hipocótilo bem desenvolvido e inicialmente curvo, foi similar ao registrado por Ferreira et al. (2013) para *Myrcia cuprea* (O.Berg) Kiaersk. Os eofilos apresentaram a mesma filotaxia e características similares das descritas por Faria et al. (2015) nas folhas dos indivíduos adultos.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que a espécie germina bem no substrato vermiculita e a complementação da descrição morfológica dos frutos e sementes trouxe dados importantes que fornecem subsídios para a conservação de

*Myrcia macrocalyx*, que se encontra em risco.

O trabalho de campo revelou uma característica incomum dentre os componentes da tribo Myrteae: frutos deiscentes. Não foram encontrados registros na literatura descrevendo espécies americanas de Myrtaceae com frutos deiscentes. Os mesmos apresentaram-se carnosos e são dispersos, em geral, por aves e macacos (Pizo, 2002; Gressler et al., 2006). Os frutos de *Myrcia macrocalyx* com deiscência irregular do pericarpo e exposição das sementes, com testa castanha lisa e glabra sugerem que não existe dispersão por qualquer animal, abrindo a possibilidade para dispersão por agentes abióticos. Esses dados abrem linhas para estudos da biologia da dispersão da espécie, conhecimento essencial para sua conservação, e ainda de registro escasso para a família de Myrtaceae no Brasil (Souza, 1997; Pizo, 2003; Sugahara e Takaki, 2004; Gressler et al., 2006).

### **Agradecimentos**

Agradeço ao artista Gilberto Fernandes Alves, pelas fotos que ilustraram o trabalho.

### **Referências**

- Abreu, D.C.A., Kuniyoshi, Y.S., Medeiros, A.C.S., e Nogueira, A.C. 2005. Caracterização morfológica de frutos e sementes de cataia (*Drimys brasiliensis* Miers. Winteraceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 27 (2): 67-74.
- Áquila, M.E.A., e Ferreira, A.G. 1984. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. *Ciência e Cultura*, 36 (9): 1583-1590.
- Almeida Jr., E.B., Lima, L.F., Lima, P.B., e Zickel, C.S. 2010. Descrição morfológica de frutos e sementes *Manilkara salzmannii* (Sapotaceae). *Revista Floresta*, 40 (3): 535-540.
- Amorim, I.L., Ferreira, R.A., Davide, A.C., e Chaves, M.M.F. 2006. Aspectos morfológicos de plântulas e mudas de Trema. *Revista Brasileira de Sementes*, 28 (1): 86-91.
- Amorim, I.L., Davide, A.C., Ferreira, R.A., e Chaves, M.M.F. 2008. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S.

Irwin & Barneby – Leguminosae Caesalpinioideae. *Revista Brasileira de Botânica*, 31(3): 507-516.

Andrade, A.C.S., Cunha, R., Souza, A.F., Reis, R.B., e Almeida, K.L. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science and Tecnology*, v.31, Pp. 125-137.

Andrade, R.N.B, e Ferreira, A.G. 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, 22 (2): 118-125.

Anjos, A.M.G., e Ferraz, I.D.K. 1999. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. Sororia). *Acta Amazonica*, 29: 337-348.

Añez, L.M.M., Coelho, M.F.B., Albuquerque, M.C.F., e Dombroski, J.L.D. 2005. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Revista Brasil Botânica*, 28 (3): 563-568.

Araújo, S.S., e Matos, V.P. 1991. Morfologia de sementes e de plântulas de *Cassia fistula* L. *Revista Árvore*, 15 (13): 217-230.

Araújo Neto, J.C., Aguiar, I.B., Ferreira, V.M., e PAULA, R.C. 2002. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). *Revista Brasileira de Sementes*, 24 (1): 203-211.

Barbedo, C.J., Kohama, S., Maluf, A.M., e Bilia, D.A.C. 1998. Germinação e armazenamento de diásporos de cereja (*Eugenia involucrata* DC. – Myrtaceae) em função do teor de água. *Revista Brasileira de Sementes*, 20: 184-188.

Barreto, S.S.B., e Ferreira, R.A. 2011. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(2): 223-232.

Barroso, G.M., Morin, M.P., Peixoto, A.L., e Ichaso, C.L.F. 1999. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. UFV, Viçosa.

Baskin, C.C., e Baskin, J.M. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. New York: Academic Press.

Brasil, Ministério do Meio Ambiente - MMA. 2008. Instrução normativa n° 6, de setembro de 2008, art. 5, Brasília-DF.

Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 2009. Regras para análise de sementes. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Departamento Nacional de Defesa Vegetal, Coordenação de Laboratório Vegetal, Brasília-DF.



- Carvalho, L.R., Silva, E.A.A., e Davide, A.C. 2006. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista brasileira de sementes*, 28 (2): 15-25.
- Castro, R.D., Bradford, K.J., e Hilhorst, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. Em *Germinação do básico ao aplicado*. Editado por A.G. Ferreira e F. Borghetti. ed. Artmed, São Paulo.
- Donadio, N.M.M., e Dematte, M.E.S.P. 2000. Morfologia de frutos, sementes, e plântulas de canafístula [*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.] e jacarandá-da-Bahia [*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.] - Fabaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, 22 (1): 64-73.
- Duke, J. A. 1965. Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 52(3): 314-350.
- El-kassaby, Y.A., Edwards, D.G.W. 1998. Genetic control of germination and the effects of accelerated aging in mountain hemlock seeds and its relevance to gene conservation. *Forest Ecology and Management*, 112: 203-211.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., e Roberts, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour. I. Coffee. *Journal of Experimental Botany*, London, 41: 1167-1174
- Fanti, S. C.; Perez, S.C.J. Influência do substrato e do envelhecimento acelerado na germinação de olho-de-dragão (*Adenanthera pavonina* L. – Fabaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 2(2): 135-141, 1999.
- Faria, J.E.Q., Gomes-Bezerra, K.M., Zanatta, M.R.V., Silva Júnior, M.C., e Soares-Silva, L.H. 2015. *Myrcia macrocalyx* (Myrtaceae), a new species from Brazil, with additional morphological highlights. *Revista Phytotaxa*, 234 (2): 179-185.
- Fermino, M.H. 1996. Aproveitamento de resíduos industriais e agrícolas como alternativas de substratos hortícolas. Dissertação, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Ferreira, A.G., e Borghetti, F. 2004. *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed. Porto Alegre.
- Ferreira, N.M.M., Santos, J.U.M., Ferreira, A.M., e Gurgel, E.S.C. 2013. Germinação de sementes e morfologia de plântula de *Myrcia cuprea* (O. Berg) Kiaersk. (Myrtaceae) espécie da restinga com potencial de uso no paisagismo. *Sociedade Brasileira de Arborização Urbana*, 8(1): 27-38.
- Fonteno, W.C. 1996. Growing media: types and physical/chemical properties. Editado por D.W., Reed. A growers guide to water, media, and nutrition for greenhouse crops. Batavia: Ball, Pp. 93-122.
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.R., Matsumoto, K., Mazine, F.F., Nic Lughadh, E., Proença, C., Soares-Silva, L.H., Wilson,

P.G., e Luca, E. 2017. World Checklist of Myrtaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://www.kew.org/wcsp/> [acessado em 17 de abril de 2017].

Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, L.P.C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Brazilian Journal of Botany. Sociedade Botânica de São Paulo*, 29(4): 509-530.

Guerra, M.E.C., Filho, S.M., e Gallao, M.I. 2006. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Cerne*, 12 (4): 322-328.

Kampf, A.N. 2000. Seleção de materiais para uso como substrato. Editado por A.N., Kampf, e M.H., Fermino. Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: *Genesis*, Pp. 139-146.

Kohaman, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C., e Barbedo, C.J. 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 72-78.

Laviola, B.G., Lima, P. A., Wagner Júnior, A., Mauri, A.L., Viana, R.S., e Lopes, J.C. 2006. Efeito de diferentes substratos na germinação e no desenvolvimento inicial de jiloeiro (*Solanum gilo* RADDI). *Ciência e Agrotecnologia*, 30(3):415-421.

Labouriau, L. G. 1983. *A germinação das sementes*. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington.

Leonhardt, C., Calil, A.C., e Fior, C.S. 2010. Germinação de sementes de *Myrcia glabra* (O. Berg) D. Legrand e *Myrcia palustris* DC. – Myrtaceae armazenadas em câmara fria. *Iheringia, Sér. Bot.*, 65 (1): 25-33.

Macvaugh, R. 1963. Tropical American Myrtaceae II. *Fieldiana, Bot.*, 29(8): 393-532.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination and in selection and evaluation for emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1): 176-177.

Maluf, A.M., Bilia, D.A.C., e Barreto, C.J. 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. Seeds. *Scientia Agricola*, 60: 471-475.

Martinelli, G.; Messina, T; Filho, L.S. 2014. *Livro Vermelho da Flora do Brasil – Plantas Raras do Cerrado*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio- Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 320 p.

Nakagawa, J. 1999. Testes de vigor baseados nos desempenhos das plântulas. Editado por F.C., Krzyzanowski, R.D. Vieira, e J. B. França Neto. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, Pp. 2.1-2.24.

NG, F.S.P. 1978. Strategies of establishment in Malayan forest trees. Editado por P.B., Tomilson, e M.H., Zimmerman. Tropical trees as living systems. Cambridge: Cambridge University Press, Pp. 129-162.

Oliveira, E.C., e Pereira, T.S. 1984. Morfologia dos frutos alados em leguminosae-Caesalpinioideae-*Martiodendron* Gleason, *Peltophorum* (Vogel) Walpers, *Sclerolobium* Vogel, *Tachigalia* Aublet e *Schizolobium* Vogel. *Rodriguesia*, 36 (60): 35-42.

Pizo, M.A. 2002. The seed dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in Brazilian Atlantic forest. In *Frugivores and seed dispersers biodiversity and conservation perspectives*. (D.J. Levey, W.R. Silva & M. Galetti, eds.), CABI Publishing, Wallingford. 129-143p.

Pizo, M.A. 2003. Padrão de deposição de sementes e sobrevivência de sementes e plântulas de duas espécies de Myrtaceae na Mata Atlântica. *Brazilian Journal of Botany*, 26 (3): 371-377.

Popinigis, F. 1985. *Fisiologia de sementes*. AGIPLAN, Brasília.

Rede de Sementes do Cerrado. 2011. Semeando o bioma cerrado – Beneficiamento, embalagem e armazenamento de sementes – Projeto semeando o Bioma Cerrado. Rede de sementes do Cerrado, Brasília.

Rego, S.S., Nogueira, A.C., Kuniyoshi, Y.S., e Santos, Á.F. 2010. Germinação de sementes *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. *Revista Brasileira de Sementes*, 31(2): 212-220.

Rizzini, C. T. 1965. Experimental studies on seedlings development of cerrado woody plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 52(3): 410-426.

Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed science and technology*, Zurich, 1: 499-514.

RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL.

Silva, J.B.C.; Nakagawa, J. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. *Informativo ABRATES*, 5(1): 62-73, 1995.

Silva, D.F.P., Cabrini, E.C., Alves, R.R., e Salimão, L.C.C. 2010. Uso do ácido ascórbico no controle do escurecimento do pericarpo de lichia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(2): 618-627.

Soares-Silva, L.H. 2000. A família Myrtaceae-subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. Tese, Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., e Lucas, E. 2015. Myrtaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> [acessado em 15 de novembro de 2016].

Souza, L. A. *Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula*. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2003.

- Souza, L. A. 2009. *Sementes e Plântulas: Germinação, estrutura e adaptação*. Toda palavra. Ponta Grossa, PR.
- Souza, M.A.D. 1997. Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Sugahara, V.Y., e Takaki, M. 2004. Effect of light and temperature on seed germination in guava (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). *Seed Science and Technology* 32:759-764.
- Tonin, G.A., e Perez, S.C.J.G.A. 2006. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. *Revista Brasileira de Sementes*, 28 (2): 26-33.
- Vale, L.S., Costa, J.V.T., Anunciação Filho, C.J., e Lima, R.L.S. 2004. Efeito de diferentes misturas de substratos e tamanho de recipiente na produção de mudas de mamoeiro. Editado por J.G., Barbosa, H.E.P., Martinez, e M.W., Pedrosa. Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato. Viçosa: UFV, Pp. 385.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Heslewood, M.M., e Quinn, C.J. 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, 251:319.

**CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE BROTOS E RIZOGÊNESE EM EXPLANTES GERMINADOS *IN VITRO* DE *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae): ESPÉCIE ENDÊMICA DO CERRADO**

**RESUMO**

A espécie *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva, recentemente descrita, é um subarbusto endêmico do bioma Cerrado com área de ocorrência restrita e poucas populações registradas para o estado de Goiás o que a coloca em perigo de extinção pelos critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN. O cultivo *in vitro* é uma via de conservação que contorna as condições naturais e possibilita a produção de grande quantidade de mudas. O trabalho teve como objetivo verificar a influência de reguladores do crescimento na indução de brotos e rizogênese de *Myrcia macrocalyx*, iniciando os estudos de micropropagação com a espécie. As sementes foram germinadas no meio ágar/água e transferidas para o meio ½ MS com combinações de BAP (0,0; 0,05; 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e AIB (0,0; 0,01 mg.L<sup>-1</sup>) para indução de brotos. Para rizogênese foi testado o meio ¼ MS com adição de (0,0; 0,1; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) AIB e (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) de carvão ativado. A porcentagem de germinação foi de 84%. Para a indução e alongamento de brotos e folhas indica-se 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Não foi possível estabelecer um protocolo de rizogênese, mas o tratamento com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de carvão ativado estimulou o alongamento dos brotos.

**Palavras-chave:** Cerrado; *Myrcia*; BAP; AIB; MS.

**THE INFLUENCE OF PLANT GROWTH REGULATORS ON THE INDUCTION OF SPROUTS AND RHIZOGENESIS IN EXPLANTE *IN VITRO* CULTURES OF *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae): A SPECIES NATIVE TO THE CERRADO BIOME**

**ABSTRACT**

The recently described *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva species is a subshrub native to the Cerrado biome which covers a small piece of land and has few registered populations in Goiás state, which puts the species in danger of extinction according to IUCN's criteria. *In vitro* cultivation is a preservation tool that overrides natural conditions and allows for the growth of a large amount of seedles. This research aimed to verify the influence of growth regulators on the induction of *Myrcia macrocalyx* sprouts and rhizogenesis, launching the micropropagation studies of this species. Seeds were germinated in an agar-water substrate and later transferred to a ½ MS substrate with BAP (0,0; 0,05; 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) and IBA (0,0; 0,01 mg.L<sup>-1</sup>) for the induction of sprouts and for rhizogenesis the chosen substrate was ¼ MS combined with IBA(0,0; 0,1; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) and (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) activated charcoal. Germination percentage was 84%. The best option for the induction and lengthening of sprouts and leaves is a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP substrate. A rhizogenesis protocol could not be defined, but 0,1 mg.L<sup>-1</sup> IBA + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> charcoal treatment stimulated the elongation of the sprout estimulou o alongamento do broto.

**Index terms:** Cerrado biome; *Myrcia*; BAP; IBA; MS.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva (Myrtaceae) é um subarbusto xilópodifero, de aproximadamente 0,5 m de altura, endêmico do bioma Cerrado. Apresenta área de distribuição restrita em campos limpos e sujos na região da Chapada dos Veadeiros – GO. Embora a espécie tenha sido recentemente descrita (FARIA et al., 2015), já se enquadra no critério de risco “Em Perigo” da União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN definido no “*Livro Vermelho da Flora do Brasil: plantas raras do Cerrado*” (MARTINELLI et al., 2014).

O cultivo *in vitro* é uma técnica baseada na totipotência das células vegetais em originar novos indivíduos (TERMIGNONI, 2005; HUSSAIN et al., 2012). A técnica permite ainda, conservação da biodiversidade (SIDDIQUE et al., 2003; FERMINO-JUNIOR et al., 2009), pois contorna as condições naturais de reprodução e possibilitam a produção de grande quantidade de mudas de qualidade, independentemente do período do ano (CASTRO et al., 2007; MONDO et al., 2008; NICIOLI et al., 2008; SILVA et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2010; CHINNAPPAN et al., 2011).

Alguns estudos foram desenvolvidos para espécies do Cerrado como para *Eugenia dysenterica* DC. (MARTINOTTO et al., 2007). No entanto, a propagação por cultura de tecidos de espécies selvagens, como é o caso da *M. macrocalyx* não é uma tarefa fácil. Em geral, há pouca informação sobre morfologia, anatomia e fisiologia das plantas nativas, o que dificulta o estabelecimento de protocolos eficientes (LIMA et al., 2015). No caso da *Myrcia macrocalyx* não é diferente, visto que não existem estudos com a espécie, o que dificulta o cultivo e, conseqüentemente, sua conservação.

Outro problema é que o material vegetal de espécies selvagens, disponível em campo, geralmente está contaminado (SILVEIRA et al., 2013; LIMA et al., 2015). Uma alternativa é a utilização de explantes a partir de plantas germinadas *in vitro* (DEWIR et al., 2011; SILVA et al., 2014). Melo et al. (2008) e Martins et al. (2011) afirmam que as sementes são menos contaminadas do que os brotos maduros retirados do campo e são mais resistentes aos tratamentos de descontaminação.

Considerando que não existem estudos de propagação de *M. macrocalyx* e a necessidade de ferramentas que viabilizem programas de conservação da espécie, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência de reguladores do crescimento na indução, alongamento e rizogênese de explantes germinados *in vitro* de *Myrcia macrocalyx*, iniciando os estudos para a micropropagação da espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Coleta e Beneficiamento** - A população amostral se encontra no município de Cavalcante – GO, na margem esquerda da estrada, sentido Sítio dos Kalungas em uma área de campo sujo (13°36'26.3''S 47°28'24.3''W em outubro de 2016). Ramos com flores foram depositadas no Herbário (UB) da Universidade de Brasília – Alves, R.U. et al. 1 (UB). Os frutos foram coletados manualmente, de vários indivíduos de uma mesma população, no entanto não é possível afirmar a ausência de clones na amostra. Após a coleta, os frutos foram armazenados em papel kraft. 3 dias após a coleta os frutos, do tipo bacáceo, foram despulpados com auxílio de pinça e bisturi. As sementes obtidas foram acondicionadas em sacos de papel *kraft* e armazenadas em geladeira em temperatura entre 6 °C a 10 °C, até a inoculação *in vitro*. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas – CRAD/UnB.

**2.2. Desinfestação, Germinação e Estabelecimento** – As sementes (n=50) foram desinfestadas em álcool 70% por um minuto e, subsequentemente, imersas em hipoclorito de sódio comercial (NaClO) (2,5% de cloro ativo) durante 25 minutos e lavadas três vezes (1, 2 e 3 minutos) em água destilada autoclavada. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm), contendo 15 mL de solução ágar-água (8 g.L<sup>-1</sup>), sendo uma semente por tubo, previamente autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, as sementes foram transferidas para a sala de cultivo a 25 °C ±1 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 41 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O número de sementes germinadas foi avaliado até 45 dias de cultivo em intervalos de 24h durante. O percentual de germinação e contaminação e Índice de Velocidade de Germinação – IVG (Maguire, 1962) foi calculado considerando germinadas as sementes com emergência de partes do embrião para fora da testa (Labouriau, 1983). Depois de germinadas segmentos das partes aéreas, de ca. de 1 cm, foram retirados de 12 plântulas com 90 dias e com ca. 20 cm, de comprimento e subcultivados no meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio foi acrescido de 20 g de sacarose, solidificado com 0,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e teve o seu pH ajustado para 5,8. A autoclavagem foi realizada a 120 °C e 1 atm de pressão durante 20 minutos e levadas para a sala de crescimento, visando obter um maior número de explantes.

**2.3. Meio de cultura** –  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{4}$  MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 20 g de sacarose, solidificado com  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. PH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão durante 20 minutos.

## **2.4. Multiplicação e subcultivos**

**2.4.1. Segmentos nodais** - Explantes de ca. 1 cm, foram inoculados verticalmente no meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com BAP ( $0,0$ ;  $0,05$ ;  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinado com AIB ( $0,0$ ;  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para realização de dois subcultivos. O primeiro e o terceiro subcultivo foram feito em tubos de ensaio sendo um explante por tubo, o segundo em frascos de vidro, 3 explantes por frasco de 250 mL. A suplementação do terceiro subcultivo foi com BAP ( $0,5$ ;  $1,0$ ;  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sendo os tratamentos formados por 24 repetições.

**2.4.2. Segmentos da raiz e do hipocótilo** – Explantes de ca. de 1cm foram inoculados em  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com ANA ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou 2,4D ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinado ou não com BAP ( $0,5$  e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Estes foram inoculados horizontalmente em frascos de vidro (250 mL) contendo 3 explantes. Todas as subculturas foram avaliadas aos 45 dias de cultivo em relação ao número de brotos; comprimento dos brotos; número de folhas; comprimento e largura da folha expandida e presença ou ausência de calos.

**2.5. Rizogênese** – Brotos de 1 a 2 cm de comprimento, originados de partes aéreas da fase anterior, foram repicados em  $\frac{1}{4}$  MS contendo AIB ( $0,0$ ;  $0,1$ ;  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com ou sem ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de carvão ativado (Sigma Chemical CO), totalizando 6 tratamentos, com 12 repetições. A presença de raiz foi avaliada aos 45 dias da cultura.

**2.6. Análise Estatística** - O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e quando os dados não seguiram a distribuição normal foram ajustados utilizando a transformação  $\sqrt{x+1}$ . Para análise da variância dos dados utilizou-se ANOVA e a comparação das médias utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas no programa SISVAR.



### 3. RESULTADOS

No 45º dia de cultivo, 84% das sementes haviam germinado e 84% das sementes se encontravam livres de contaminação. O IVG foi de aproximadamente, 4 dias e as plântulas apresentavam em média 8,73 cm de comprimento (Tabela 1).

O desenvolvimento da plântula iniciou-se a partir do eixo hipocótilo-radicular dando origem à raiz primária que variou de 1 a 15,8 cm de comprimento. Aos 45 dias, as raízes se encontravam enoveladas no fundo do tubo de ensaio. O hipocótilo encontrava-se bem desenvolvido, variando de 0,5 a 3 cm de comprimento. Os cotilédones coriáceos começaram a se distender por volta do 22º dia e aos 45 dias de cultivo apresentavam em média 0,54 x 0,72 cm (Tabela 1; Figura 1).

O conteúdo de água presente nas plântulas aos 45 dias foi de, aproximadamente, 74% de seu peso fresco (Tabela 2).

**Tabela 1:** Caracteres morfométricos de 40 plântulas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva germinadas *in vitro* aos 45 dias após a inoculação (ágar-água).

	Comp. (cm)	Raiz		Hipocótilo		Cotilédone		Epicótilo	Eofilo
		Comp. (cm)	Larg. (mm)	Comp. (cm)	Larg. (mm)	Comp. (cm)	Larg. (mm)	Comp. (cm)	Comp. (cm)
<b>Mínimo</b>	1,00	1,00	0,01	0,50	0,84	0,20	0,01	0,01	0,01
<b>Máximo</b>	20,00	15,80	1,29	3,00	2,75	1,70	2,20	1,20	1,70
<b>Média</b>	8,73	6,13	0,67	1,57	1,54	0,54	0,72	0,20	0,18
<b>D.P.</b>	4,49	3,64	0,25	0,53	0,42	0,63	0,85	0,37	0,40
<b>Variância</b>	20,16	13,26	0,06	0,29	0,17	0,39	0,72	0,14	0,16

**Abreviações:** D.P – Desvio Padrão; Comp. – comprimento; Larg. – Largura. (n=40)

**Tabela 2:** Peso da matéria fresca, seca e teor de água (%) das plântulas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva germinadas *in vitro* aos 45 dias após a inoculação na solução ágar-água.

	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Teor de água (%)
<b>Mínimo</b>	0,09	0,02	54,15
<b>Máximo</b>	0,55	0,18	86,91
<b>Média</b>	0,28	0,07	73,60
<b>Desvio Padrão</b>	0,11	0,03	6,59

Na análise de multiplicação e subcultivos de segmentos nodais, não foram observadas diferenças significativas no primeiro subcultivo para número e dimensões das folhas expandidas e, no segundo subcultivo, para o comprimento dos brotos (Tabela 3). No primeiro e segundo subcultivo, a maior média para número e comprimento de brotos foi obtida no tratamento com BAP 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Em relação ao número de brotos no segundo subcultivo a maior média foi encontrada no mesmo tratamento. Houve

alongamento e formação de brotos em todos os tratamentos, mesmo no controle. Não houve diferenças significativas entre os subcultivos (Tabela 3; Figura 1).

**Tabela 3:** Multiplicação e alongamento de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva. Tratamentos, médias de número de brotos e comprimento (cm) dos brotos dos explantes para cada subcultivo das partes aéreas. Os dados representam as médias de repetições por tratamento.

BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	+	AIB (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de Brotos		Comprimento dos Brotos	
			Sub. 1	Sub. 2	Sub. 1	Sub. 2
0,00	+	0,00	1.45 ab A	1.36 a A	1.61 ab A	1,14 a A
0,05	+	0,00	1.73 b A	1.66 b A	1.72 b A	1,79 a A
0,50	+	0,00	1.66 ab A	1.57 ab A	1.31 a A	1,11 a A
0,00	+	0,01	1.41 ab A	1.40 ab A	1.52 ab A	1,47 a A
0,05	+	0,01	1.42 ab A	1.39 ab A	1.60 ab A	1,46 a A
0,50	+	0,01	1.34 a A	1.52 ab A	1.57 ab A	1,23 a A

As letras minúsculas comparam os resultados apenas na mesma subcultura (coluna), enquanto as letras maiúsculas comparam os tratamentos entre as subculturas (linhas). Os resultados seguidos pelas mesmas letras, na mesma coluna ou linha, são estatisticamente similares e foram calculados pelo teste T (p = 0,05).

Em relação ao número de folhas, o tratamento com BAP 0,05 mg.L<sup>-1</sup> + AIB 0,01 mg.L<sup>-1</sup> apresentou maior média, embora seja estatisticamente similar ao tratamento com AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) e o tratamento com BAP (0,05 mg.L<sup>-1</sup>).

O tratamento com AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) foi diferente estatisticamente aos demais tratamentos para “largura das folhas”. Para o “comprimento das folhas” o mesmo tratamento foi superior estatisticamente embora só apresente diferença significativa entre o controle e o tratamento BAP (0,05 mg.L<sup>-1</sup>) (Tabela 4; Figura 1).

**Tabela 4:** Multiplicação e alongamento de folhas de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva. Tratamentos, médias do número, comprimento (cm) e largura (cm) das folhas expandidas, respectivamente, dos explantes na 2ª subcultura das partes aéreas. Os dados representam as médias de repetições por tratamento.

BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	+	AIB (mg.L <sup>-1</sup> )	Número	Comprimento	Largura
0,00	+	0,00	1.53 a	1.13 a	1.00 a
0,05	+	0,00	2.47 b	1.21 ab	1.00 a
0,50	+	0,00	2.23 ab	1.09 a	1.00 a
0,00	+	0,01	2.39 b	1.33 b	1.06 b
0,05	+	0,01	2.95 b	1.18 ab	1.00 a
0,50	+	0,01	2.22 ab	1.11 ab	1.00 a

As letras minúsculas comparam os resultados apenas na mesma subcultura (coluna). Os resultados seguidos pelas mesmas letras, na mesma coluna, são estatisticamente similares a partir do cálculo do teste T (p = 0,05).

Ao final dos 45 dias do terceiro subcultivo, com as alterações dos fitorreguladores, 96% dos explantes utilizados no experimento estavam ressecados, com

aparência de mortos, e sem nenhuma brotação. Apenas três explantes apresentaram brotações, sendo dois no tratamento com BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e um em BAP 1,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Em relação à multiplicação de explantes da raiz e do hipocótilo, houve ocorrência de brotamentos em apenas seis explantes inoculados, sendo quatro no tratamento com BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e dois no tratamento com BAP 1,0 mg.L<sup>-1</sup> + ANA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Em todos os tratamentos, mesmo no controle, apareceram calos de coloração marrom ou verde. No tratamento 2,4D 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 80% dos explantes apresentavam calos ( Figura 1).

**Tabela 5:** Presença de calos em explantes da raiz e do hipocótilo de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva em 7 tratamentos.

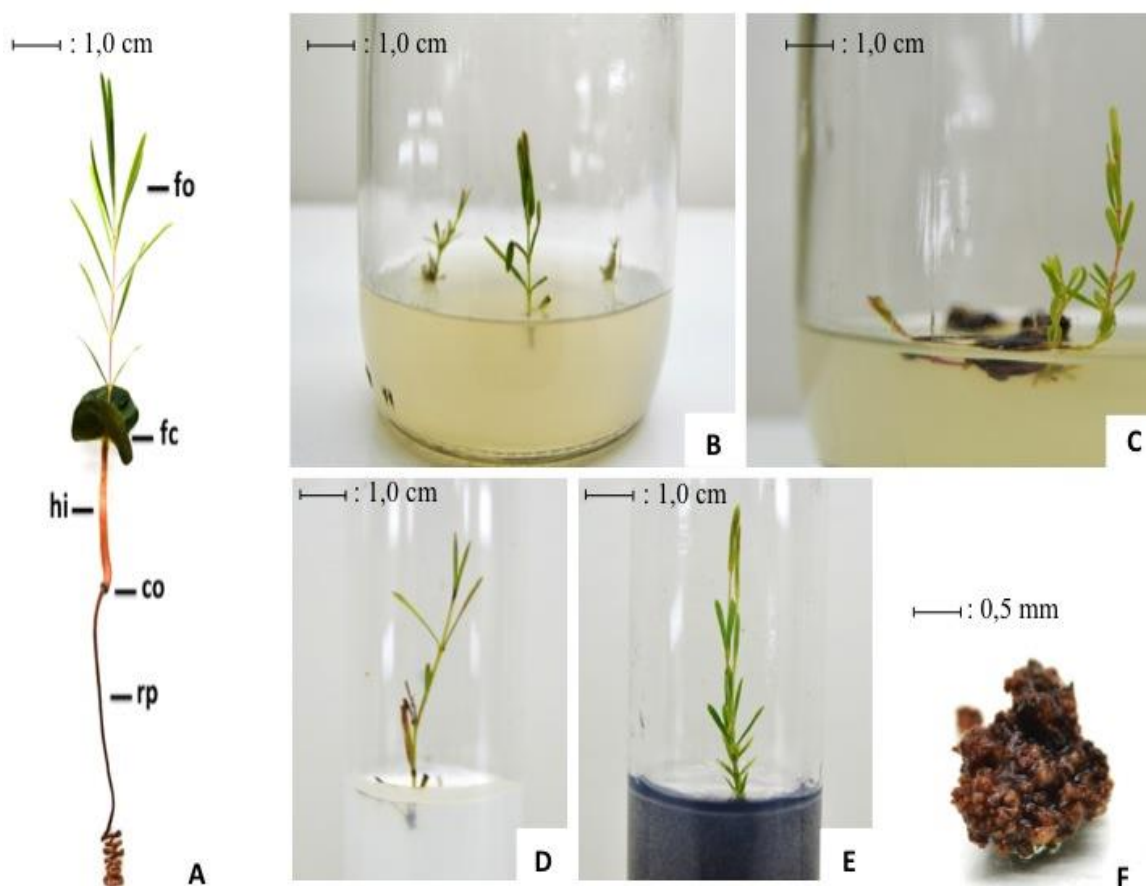
BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	+	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	+	2,4D (mg.L <sup>-1</sup> )	Presença de calos
0,0	+	0,0	+	0,0	37%
0,5	+	0,0	+	0,0	50%
1,0	+	0,0	+	0,0	21%
0,0	+	0,5	+	0,0	1%
0,5	+	0,5	+	0,0	8%
1,0	+	0,5	+	0,0	8%
0,0	+	0,0	+	0,5	80%

No experimento de rizogênese, não houve enraizamento em nenhum dos tratamentos testados. O tratamento com AIB 0,1 mg. L<sup>-1</sup> + carvão ativado 1,5 mg. L<sup>-1</sup> apresentou média superior aos demais tratamentos e diferença significativa em relação ao tratamento controle para “alongamento do broto” (Tabela 6; Figura 1).

**Tabela 6:** Efeito do AIB e do carvão ativado no alongamento de brotos de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva. Tratamentos, médias do comprimento (cm) dos brotos após o experimento de rizogênese. Os dados representam as médias de repetições (n=12) por tratamento.

AIB (mg.L <sup>-1</sup> )	+	Carvão ativado (mg.L <sup>-1</sup> )	Comprimento dos Brotos (cm)
0,0	+	0,0	1.31 a
0,0	+	1,5	1.54 ab
0,1	+	0,0	1.54 ab
0,1	+	1,5	1.58 b
1,0	+	0,0	1.48 ab
1,0	+	1,5	1.54 ab

As letras minúsculas comparam os resultados entre os tratamentos. Os resultados seguidos pelas mesmas letras, na mesma coluna, são estatisticamente similares a partir do cálculo do teste T (p = 0,05).



**Figura 1:** Multiplicação de *Myrcia macrocalyx* Faria & Soares-Silva. A – Plântula com 50 dias após a inoculação no meio ágar/água. B - Explantes após 45 dias de inoculação no meio  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP (2ª subcultivo). C - Brotos com 60 dias originados a partir de segmentos da raiz no meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com BAP ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + ANA ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). D – Explante de segmento nodal com 60 dias após inoculação no meio de cultura  $\frac{1}{4}$  MS com  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB. E – Explante de segmento nodal com 60 dias após inoculação no meio de cultura  $\frac{1}{4}$  MS com  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB +  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de carvão ativado. F - Calos originados de segmentos nodais da raiz no meio  $\frac{1}{2}$  MS com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4D.

#### 4. DISCUSSÃO

O estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* pode ser extremamente eficiente para preservar a biodiversidade do Cerrado (SILVA et al, 2008), considerando que a vegetação nativa do Cerrado vem sendo gradualmente devastada por atividades agrícolas e muitas espécies pouco conhecidas já se encontram ameaçadas (MOFFAT, 2002; KLINK; MACHADO, 2005; MAGRIN et al., 2014). Para isso, é necessário desenvolver metodologias de desinfestação que permitam o crescimento da planta sem microorganismos exógenos e/ou endógenos. Sabendo que, em geral, as sementes são menos contaminadas e mais resistentes aos tratamentos de desinfestação (MELO et al.,

2008; SILVA et al., 2008) o presente estudo as utilizou como fonte de explantes.

Segundo Rocha (2005), o hipoclorito de sódio é um oxidante que pode resultar em modificações nas membranas celulares da testa da semente acarretando em um aumento na absorção de oxigênio e, conseqüentemente, na porcentagem de germinação, fato que pode explicar o resultado encontrado - germinação e descontaminação de 84% para *M. macrocalyx*. Para a espécie *Eugenia uniflora* L., da mesma família, os autores Silva et al. (2014) atingiram resultados 15% melhores em relação a germinação e descontaminação (98%), utilizando a mesma solução (ágar-água) e mesmo tempo de imersão no hipoclorito (1,25%), a diferença de resultado pode ter ocorrido em função do transporte e armazenamento das sementes de *M. macrocalyx* antes da execução do teste, uma vez que ainda não se tem dados sobre viabilidade das sementes.

Além da viabilidade, Pasqual (2001) indica que a escolha do meio de cultura é parte essencial do cultivo *in vitro*, necessitando de constantes aprimoramentos para que resulte em uma maior resposta de germinação. Nesse sentido, é possível que o percentual de germinação *in vitro* seja aumentado mediante a adoção de meios de cultura que apresentem macro e micronutrientes em sua composição, como por exemplo, os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Wood Plant Meedium – WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) que vem sendo amplamente utilizados para frutíferas do Cerrado (LONDE et al., 2007) mas não testados no presente trabalho. Em função do alto custo da técnica e dos meios de cultura, em geral, o uso da solução ágar/água tem sido uma alternativa de baixo custo que apresenta resultados satisfatórios (ERIG; SCHUCH, 2005; FÁRI; MELO, 2005; RIBEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Para a multiplicação de *M. macrocalyx*, a diluição de ½ do meio MS se mostrou eficiente, da mesma forma que foi usado para trabalho com *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (FRANÇA et al., 1995), *Alibertia edulis* Rich (SILVA et al., 2008) e *Jacaranda ulei* Bureau and K. Schum (SILVEIRA et al., 2013).

Outro fator que pode influenciar o desenvolvimento dos explantes, durante o cultivo *in vitro*, é a interação entre as concentrações de reguladores de crescimento e os hormônios presentes nas plantas (MERCIER et al., 2003). Os dados mostraram que a citocinina BAP na concentração de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> resultou em maior produção de brotos (aproximadamente 2 brotos/explantes) nas duas subculturas, com segmentos nodais, em comparação com os demais tratamentos para *M. macrocalyx* e brotos maiores (1,72 cm - 1º subcultura; 1,79 cm - 2º subcultura). Os resultados foram diferentes dos obtidos por

Scutti e Zanette (2000); Brondani et al (2009); Rossato et al (2015) e Rai et al (2009) os quais trabalharam com outras espécies da família Myrtaceae e que, em geral, recomendam concentrações acima de 0,25 até 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Na literatura está bem documentado o potencial das auxinas no alongamento e rizogênese de explantes (LITTLE; MACDONALD, 2003; NURI, 2004; SOARES et al, 2007) e das citocininas na indução brotações (PEREZ-TRONERO et al., 2000), mas os efeitos desses reguladores do crescimento nem sempre são os mesmos nas diferentes espécies estudadas (PASQUAL, 2001). Dessa forma, não é incomum encontrar citocininas que promovam o alongamento como ocorreu com a *M. macrocalyx* (DEBNATH, 2005; KHALEKUZZAMAN et al, 2003). É importante ressaltar que embora não tenham induzido a formação de raízes, a auxina AIB influenciou no alongamento dos explantes quando combinada ao carvão ativado e na indução e alongamento de folhas quando combinado a citocinina BAP.

Em relação às folhas, os resultados encontrados na segunda subcultura podem indicar que o número de subculturas subsequentes pode ter um efeito importante na indução e alongamento das folhas. O efeito dessas consecutivas subculturas pode estar associado ao equilíbrio entre os reguladores de crescimento e os hormônios, visto que os hormônios presentes na planta podem diminuir de uma subcultura para outra (SILVA et al., 2008). A maior média foi encontrada no tratamento com a combinação de BAP 0,05 mg.L<sup>-1</sup> + AIB 0,01 mg.L<sup>-1</sup>. A combinação de auxinas e citocininas foi relatado como eficiente em protocolos de propagação *in vitro* de outras espécies do Cerrado, como *Kielmeyera coriacea* (ARELLO e PINTO, 1993) e *Alibertia edulis* Rich (SILVA et al., 2008).

Assim como no experimento de Silva et al (2014) e Rossato et al (2015), não foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a indução de rizogênese de *M. macrocalyx*, mesmo na presença das auxinas ANA, 2,4-D e AIB e do carvão ativado. Situação registrada com frequência na literatura para diversas espécies (ROHN; HANUS, 1987; LEITE et al., 2007; GOLLE et al., 2012).

Segundo Hackett (1988), a habilidade de enraizamento dos explantes declina com a maturidade. De acordo com Rotundo (1993), isso ocorre por que há significativas alterações na capacidade morfogenética dos tecidos quando as espécies passam do estado juvenil para o adulto. McCown (1988) e Pasqual (2001) indicam que, em alguns casos, o problema pode ser resolvido com contínuas subculturas que promovem o

rejuvenescimento dos tecidos e aumentam a capacidade de enraizamento. Embora a presente pesquisa tenha utilizado explantes subcultivados três vezes, não houve formação de raízes para a espécie estudada. Souza e Pereira (2007), em revisão sobre “enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*”, relatam que muitos trabalhos têm revelado que fatores genéticos, pH e meio de cultura, também podem estar ligados a capacidade dos explantes da espécie em formar ou não raízes.

Embora não tenha ocorrido a formação de raízes, foi possível verificar a grande ocorrência de calos que podem ter aparecido em função das condições do tratamento com a auxina 2,4-D. Essas células, quando estimuladas, podem formar embriões somáticos, brotos e raízes, o que permite estudos de regeneração de plantas a partir de células isoladas (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004; MA et al., 2009), abrindo precedentes para novos questionamentos e estudos com a espécie. Outra possibilidade é a continuidade com estudos que viabilizem a indução de brotos a partir de segmentos da raiz e do hipocótilo, uma vez que mesmo com uma baixa representatividade estatística foram registrados brotos nesses tipos de explantes.

## 5. CONCLUSÃO

Os protocolos iniciados nesse trabalho necessitam de continuidade, principalmente no que se refere a etapa de rizogênese da espécie. A utilização de sementes como fonte de explantes assim como a solução de ágar/água são indicados para a germinação *in vitro* da espécie em função do baixo custo e alto percentual germinativo. O protocolo de assepsia foi considerado eficaz para desinfestação das sementes da espécie, visto que apresentou baixo nível de contaminação e possibilidade de orientação para a elaboração de protocolos em tecidos maduros. Para a indução e alongamento de brotos indica-se BAP 0,05 mg. L<sup>-1</sup> em ½ MS e para indução e alongamento das folhas a combinação de BAP e AIB em baixas concentrações.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao artista, Gilberto Fernandes Alves, pelas fotos que ilustraram o trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: I Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.1, p. 25-35, 1993.

- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento in vitro de *Eucapypptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunii* Maiden. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.33, n.1, p.11-19, 2009.
- CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; VITOR, S.M.M.; FERNANDES, A.M. Cultivo in vitro e aspectos da anatomia foliar de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae Papilionoideae]. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 3: 61-68, 2007.
- CHINNAPPAN, R. S.; RUTHAR, N.; SETHU, S. S. Rapid *in vitro* propagation of *Premna serratifolia*, a medicinally important declining shrub, Índia. *Conservation Evidence*, 8: 66-73, 2011.
- DEBNATH, S.C. A Two-step procedure for adventitious shoot regeneration from *in vitro* derived Lingonberry leaves, shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin. *HortScience*, 40: 189-192, 2005.
- DEWIR, Y.H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A.M.K. Micropropagation and detection of important triterpenes *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14): 3078-3083, 2011.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.K. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(4): 961-965, 2005.
- FARIA, J.E.Q.; GOMES-BEZERRA, K.M., ZANATTA, M.R.V., SILVA JÚNIOR, M.C.; SOARES-SILVA, L.H. *Myrcia macrocalyx* (Myrtaceae), a new species from Brazil, with additional morphological highlights. *Revista Phytotaxa*, 234 (2): 179-185. 2015.
- FÁRI, M.; MELO, N.F. Automatização e racionalização na micropropagação industrial. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abct26.htm>>. Acesso em: 16.07.2017.
- FERMINO-JUNIOR, P.C.P., NAGAO, E.O., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.f.). *Scientia Agricola*, Piracicaba, 37(84): 427-435, 2009.
- FRANÇA, S.C.; DUARTE, I.B.; MORAES, R.M.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42: 291-293, 1995.
- GOLLE, D.P; REINIGER, L.R.S; CURTI, A.R.; LEÓN, E.A.B. Estabelecimento e desenvolvimento in vitro de *Eugenia involucrata* DC.: influencia do tipo de explante e do meio nutritivo. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 22(1): 207-214, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa- SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, 183-260p.



- HACKETT, W.P. Donor plant maturation and adventitious root formation. *In*: DAVIS, T.D.; HAISSING, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings, Portland:Discorides Press, 1988. v.2, 11-28p.
- HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *In*: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. *Recent advances in plant in vitro culture*. 1st edition. InTech, Croatia, 2012. 210p.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147-155. 2005.
- KHALEKUZZAMAN, M.; ALAM, M.F.; NURUZZAMAN, M.; BEGUM, N.; AHMED, M.G.; ISLAM, M.A.; JOARDER, O.I. Clonal propagation of *Averrhoa carambola* linn. through nodal culture of mature tree. *J. Biol. Sci.*, 3: 1153-1157, 2003.
- LABOURIAU, L. G. *A germinação das sementes*. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.
- LEITE, G.L.D.; VELOSO, R.V.S.; CASTRO, A.C.R.; LOPES, P.S.N.; FERNANDES, G.W. Effect of AIB on quality and phytossanitary of *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*) air layering. *Revista Árvore*, 31(2): 315-320, 2007.
- LIMA, M.R.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. *In Vitro* Multiplication from Seeds and Adult Explants of two Ornamental *Ruellia* (Acanthaceae) species of Brazilian Savanna (Cerrado). *Phyton*, 55(2): 193-320, 2015.
- LITTLE, C.H.A.; MACDONALD, J.E. Effects of exogenous gibberellin and auxin on shoot elongation and vegetative bud development in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea glauca*. *Tree Physiology*, 23: 73- 83, 2003.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proceedings of International Plant Propagation Society*, 30:421-427. 1980.
- LONDE, L.N.; SOUSA, C.S.; VIEIRA, C.U.; BONETTI, A.M.; KERR, W.E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Bioscience Journal*, v.23, n.3, p.94-100, 2007.
- MAGRIN, G.O., J.A. MARENGO, J.-P. BOULANGER, M.S. BUCKERIDGE, E. CASTELLANOS, G. POVEDA, F.R. SCARANO, S. VICUÑA, América Central e do Sul. *In*: Mudanças Climáticas 2014: Impactos, Adaptação e Vulnerabilidade. Parte B: Aspectos Regionais. Contribuição do Grupo de Trabalho II para o Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido e Nova York, NY, Estados Unidos, 2014. 1499-1566p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination and in selection and evaluation for emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1): 176-177. 1962.

- MARTINELLI, G. ; MESSINA, T; FILHO, L.S. *Livro Vermelho da Flora do Brasil – Plantas Raras do Cerrado*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio- Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014. 320 p.
- MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). *Revista Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 31(6): 1668-1671, 2007.
- MARTINS, L.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W. Micropropagation and conservation of *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. *in vitro* germoplasm bank. *Ciência Rural*, 41: 454–458, 2011.
- MA, X.Y., GANJUN, Y.;XUELIN, H.; JIWU, Z. Leaf callus and suspension culture establishment in lychee (*Lichi chinesis* Sonn.) cv. ‘Huaizh’. *Acta physiology plantarum*, 31(2): 401-405, 2009.
- MCCOWN, B.H. *Adventitious rooting of tissue cultured plants*. In: DAVIS, T.D.; HAISSING, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings, Portland:Discorides Press, 1988. v.2, 289-302p.
- MELO J.T.; TORRES, R.A.A.; SILVEIRA, C.E.; CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de plantas do Cerrado. In: SANO S.M.; ALMEIDA S.P.; RIBEIRO, J.F. (eds.), *Cerrado: Ecologia e flora*. 1.ed., EMBRAPA Cerrados, Brasília, 2008. 319–342p.
- MERCEIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.*, 15: 107-112, 2003.
- MOFFAT, A.S. Brazilian ecosystems: history, management, and preservation: South American Landscapes. *Ancient and Modern Sci.*, 296:1959-1961, 2002.
- MONDO, V.H.V; BRANCALION, P.H.S.; CICERO, S.M.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; DOURADO NETO, D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, São Paulo, 30(2): 177-183, 2008.
- MURASHINGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497. 1962.
- NICIOLO, P.M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SANTANA, J.R.F.; SILVA, C.L.; SILVA, D.P.R.; PORTO, J.M.P. Adjustment of the process of micropropagation of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Ciência Rural*, 38: 685-689, 2008.
- NURI, M. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. *Turk. J. Agric. Forest.*, 28:189-194, 2004.
- PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologias e aplicações: meios de cultura. 1ºed. Lavras, UFLA/FAEP, 2001. 74p.

- PÉREZ-TORNERO, O.; LOPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Ashford, v.75, p.283-286, 2000.
- QUOIRIN, M.; SILVA, M.C.; MARTINS, K.G.; OLIVEIRA, D.E. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 66: 199- 205, 2001.
- RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(1): 29-38, 2009.
- RIBEIRO, J.M.; PINTO, M.S.T.; TEIXEIRA, S.L. Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudanças *In Vitro*. Documentos online 256, Embrapa Semiárido Petrolina, PE, 2013. 24p.
- ROCHA, S.C. Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*). 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ROHN, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. *Canadian Journal of Forest Research*, 17(5): 418-420, 1987.
- ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P.V.; NETTO, A.P. da C.; SOUZA, G.C. de; REIS, E.F. DOS; STEIN, V.C. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. *Plant Cell Cult. Micropropag.*, Lavras, 11(2): 70-77, 2015.
- ROTUNDO, J.C. Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook. 1993. 97 p. Dissertação de mestrado em ciências florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SCUTTI, M.B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. *Scientia Agraria*, 1 (1-2):75-82, 2000.
- SIDDIQUE, N.A.; BARI, M.A.; KHATUN, N.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.H.; HUDA, S. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (*Anantamul*) an endangered medicinal plant in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences*, 3: 1158-1163, 2003.
- SILVA, F.A.B.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. *In vitro* micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. (Quince). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51: 1103-1114, 2008.
- SILVA, P.R.; RISPOLI, R.G.; MINOZZO, M.M.; JOBIM, L.H.; STEFENON, V.M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. *Annals of Forest Research*, 57(1): 39-45, 2014. DOI:10.15287/afr.2014.179.
- SILVEIRA, C.E.S.; FUKUDA, W.S.; MIRANDA, T.D.; PALHARES D.; PEREIRA, L.A.R. *Jacaranda ulei* Bureau and K. Schum. (Bignoniaceae): *in vitro* seedling developmental study as contribution towards the domestication of this medicinal

Brazilian savannah species. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 85–89, 2013.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4): 1048-1053, 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000400016.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, 9(4): 103-111, 2007.

SRIVASTAVA N.; KAMAL, B.; SHARMA, V.; NEGI, Y. K.; DOBRIYAL, A. K.; GUPTA, S.; JADON, V. S. Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum* an endangered medicinal herb. *Academic Arena*, 2: 37–42, 2010.

TERMIGNONI, R.R. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182 p.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). *Acta Amazonica*, Manaus, 34(4): 507-511, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é o primeiro a registrar as características morfológicas das plântulas e do processo germinativo de *Myrcia macrocalyx*, além de testar as técnicas de propagação *in vitro* e *ex vitro* com a espécie. Esta dissertação registra dados importantes sobre o desenvolvimento de suas fases iniciais como a característica de deiscência do fruto, considerado incomum para as espécies do gênero *Myrcia*.

A partir dos dados coletados, foi aberta a possibilidade de novos estudos com a tribo Myrtae e a possibilidade de pesquisas que permitam o entendimento da biologia da dispersão da *M. macrocalyx*, contribuindo para a conservação da espécie. Além da descrição da plântula e do processo germinativo que podem auxiliar na identificação da espécie em campo e no registro de novas populações, visto que a mesma apresenta uma área de distribuição restrita com poucas populações conhecidas.

Embora o protocolo de germinação por técnicas tradicionais (*ex vitro*) tenha sido estabelecido, ainda há muito a ser feito para estabelecimento de um protocolo *in vitro* eficiente, principalmente no que se refere à rizogênese e fases subsequentes (aclimatização e aclimatação). O estudo resulta em explantes descontaminados a partir de sementes germinadas *in vitro* e respostas de indução e alongamento dos brotos por meio de reguladores de crescimento, o que possibilita o direcionamento para a conclusão desses protocolos.

Dessa forma, acredita-se que a totalidade deste estudo forneça ferramentas para elaboração de estratégias de conservação da espécie e ampliação dos estudos de cultivo *in vitro* de outras espécies nativas do Cerrado.